



**ESTANDARIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE
PROTEÍNAS DE VIRULENCIA DE *Phytophthora palmivora* EN
HOJAS DE PALMA DE ACEITE.**

KAREN XIMENA SANDOVAL PARRA

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE
PROTEÍNAS DE VIRULENCIA DE *Phytophthora palmivora* EN
HOJAS DE PALMA DE ACEITE.**

KAREN XIMENA SANDOVAL PARRA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga.

Directora:

Bióloga, M.Sc., MARIANA HERRERA CORZO

Codirector:

Biólogo, M.Sc., JORGE PACHÓN GARCÍA

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

PASANTÍA ENMARCADA DENTRO DEL PROYECTO:

"Estrategia de selección de materiales de *Elaeis guineensis* resistentes a la Pudrición del Cogollo mediante expresión transitoria de proteínas de virulencia de *Phytophthora palmivora*".

Proyecto aprobado por COLCIENCIAS, en la convocatoria 713-215. Código 726271353175 y Número de Contrato 158-2016.

ENTIDADES EJECUTORAS DEL PROYECTO:

CENIPALMA

Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite.

COLCIENCIAS

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación.

DEDICATORIA

A toda mi **familia**, por ser personas amables, decentes y generosas, y, en especial a mis **padres** y a mi **hermana**, por ser los pilares, sin los cuales no me podría sostener, por jamás dejarme pensar que no podía hacer cualquier cosa que me propusiera y por siempre procurar rodearme del mejor ejemplo posible.

A los profesores M.Sc. **Jorge Pachón** y PhD. **Jaime Marín**, por ser mis mentores e inspirarme a perseguir el sueño de cambiar los paradigmas de nuestra sociedad y realidad a través de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite **-Cenipalma-**, al programa de **Biología y Mejoramiento**, al Laboratorio de **Biología Molecular y Microbiología**, y a cada una de las personas involucradas en los mismos, por la convocatoria de pasantía, y el espacio brindado para llevar a cabo el proyecto.

A la **Universidad de los Llanos** y las diferentes dependencias en las que conocí personas que contribuyen a mi formación como profesional y como persona.

A mi tutora M.Sc. **Mariana Herrera Corzo**, por su apoyo, guía y colaboración durante el proceso de pasantía encaminada a la obtención de mi título.

A los investigadores M.Sc. **María Camila Rodríguez** y M.Sc. **Norman Urrego**, y los auxiliares de laboratorio Ing. **Jairo Tafúr**, Ing. **Diana Ramos** y **Sandra Vidal**, por su acompañamiento y disposición en el laboratorio, y por hacer ameno el tiempo transcurrido allí.

A los jurados PhD. **Diego Villanueva** y PhD. **Jaime Marín**, por sus valiosos aportes y sugerencias durante el proyecto de pasantía.

A los docentes del programa de biología, por dar forma a la profesional en la que me convertiré al transmitir sus conocimientos de manera integral, especialmente a **Luz Stella Suárez**, M.Sc. **Jesús Vásquez**, PhD. **Miguel Navarro**, PhD. **Martha Ortíz** y M.Sc. **Mónica Medina**, M.Sc. **Jorge Avendaño**, y M.Sc. **Daniel Aguilera**.

A mis compañeros de carrera con quienes comparto buenos momentos en los que aprendemos, tanto profesional como personalmente. Un cariñoso reconocimiento a los que me han demostrado su apoyo y brindado sus ánimos y consejos, **Juan Jair**, **Yulieth**, **Isabela**, **Javier**, **Liz**, **Sol**, **Wilmer**, **Jhon**, **Maira**, **Alejandro** y **Franklin**.

RESUMEN

El cultivo de la palma de aceite y su industria se encuentran en constante crecimiento. Sin embargo, su sostenibilidad se ve limitada por factores bióticos como los microorganismos patogénicos. La pudrición del cogollo ha sido una grave enfermedad en la palma de aceite en Colombia y en países vecinos por más de 40 años, causando la destrucción de miles de hectáreas. La búsqueda del patógeno tomó décadas, y en el 2008 se logró identificar a *Phytophthora palmivora* como el oomicete causal de la enfermedad. Dada la necesidad de encontrar cultivares resistentes a este microorganismo, se planteó el estudio de proteínas efectoras que el patógeno libera al hospedero para iniciar su proceso de infección. Para lo anterior, se normalizaron los parámetros físicos y biológicos del bombardeo de efectores sobre foliolos, estimando su eficiencia por medio de genes reporteros. Se evaluó así la expresión de tres efectores de *P. palmivora* sobre dos cultivares de palma de aceite mediante dos ensayos histoquímicos indicadores de muerte celular: DAB y NBT. Con este estudio fue posible encontrar la combinación de factores físicos y biológicos que da lugar a una transformación eficaz, según la expresión del gen *GUSPlus*, para cada uno de los cultivares. El gen *GFP* probó no ser el adecuado para el seguimiento de la transformación en callo, ya que el callo es autofluorescente. El ensayo DAB señaló, al comparar la respuesta del cultivar OxG frente a cada uno de los tres efectores, que hay diferencias significativas indicando que este se ve más afectado por el E2 y E19. Por otro lado, *Elaeis guineensis*, no mostró diferencias significativas entre la afectación por cada efector. Al confrontar cada cultivar expresando un efector determinado, se encontró que el E19 deriva en muerte celular significativamente diferente entre el OxG y *E. guineensis*. En cuanto a la tinción NBT, se obtuvo que al analizar cada efector, la producción de ERO es significativamente diferencial en cada cultivar en los casos de E2 y E19. De manera general, el cultivar *E. guineensis* exhibe mayor muerte celular que OxG a lo largo de los ensayos de transformación.

Palabras clave: Biobalística, ERO (ROS), Efectores, Palma de aceite, *Phytophthora palmivora*.

ABSTRACT

Oil palm crops and its industry are constantly growing. However, its sustainability is limited through biotic factors like pathogenic microorganisms. The bud rot has been a major oil palm disease in Colombia and nearby countries for over 40 years, where is responsible for the destruction of thousands of hectares. The search for the pathogen took decades, and in 2008 the causing oomycete was identified as *Phytophthora palmivora*. Given the necessity to find resistant cultivars to this microorganism, the study of effectors, virulence proteins that the pathogen releases to the host in order to start its colonization, was suggested through a standardization of the transient biolistic expression process. To perform the above, the biological and physical parameters of microparticle bombardment of effectors on leaves were optimized, estimating its efficiency through reporter genes. The expression of three effectors on two different oil palm cultivars was evaluated by the means of two histochemical assays that indicate cell death: DAB and NBT. It was possible to achieve the right combination of physical and biological factors that result in an efficient transformation, according to *GUSPlus* gene expression, for each one of the cultivars. The *GFP* gene probed not to be a suitable marker gene for transformation in callus, given that these are autofluorescent. DAB assay showed: by comparison of OxG cultivar response against each of the effectors, that there are significant differences indicating that is mostly affected by E2 y E19. On the other hand, *Elaeis guineensis*, did not displayed significant differences between the affectation for each effector. When confronting each cultivar expressing a determined effector, it was found that E19 drifts in significantly different cell death between OxG and *E. guineensis*. Finally, the NBT stain presented that each effector, the ROS production is different for each cultivar, in the cases of E2 and E19. Overall, *E. guineensis* showed greater cell death than OxG through all the transformation assays.

Key words: Biolistic, ROS (Reactive Oxygen Species), Effectors, Oil palm, *Phytophthora palmivora*.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS.....	13
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	21
MARCO TEÓRICO.....	22
Palma de aceite y su cultivo.....	23
Pudrición del cogollo.....	25
Generalidades de <i>Phytophthora palmivora</i>	26
Interacciones moleculares planta-patógeno.....	28
Efectores y efectorómica.....	30
Transformación genética en plantas.....	32
Expresión transitoria en palma de aceite.....	34
METODOLOGÍA.....	37
Material vegetal.....	37
Figura 7. Arreglo final del callo en cajas de Petri previo al bombardeo.....	42
Constructos plasmídicos.....	42
Preparación ADN-Microcarriers.....	44
Ensayos de transformación mediante bombardeo por biobalística.....	44
Figura 8. Pistola de biobalística empleada en los ensayos.....	44
Figura 9. Secuencia de montaje set de biobalística.....	47
Ensayos con genes marcadores.....	48
Detección de β -glucuronidasa mediante tinción con buffer GUS (X-Gluc).....	48
Ensayo de microscopía fluorescente con GFP.....	48
Ensayos histoquímicos indicadores de posible muerte celular (HR).....	48
Prueba DAB (3,3'-diaminobenzidina).....	49

Prueba NBT (Nitro Blue Tetrazolio).....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
Eficiencia y seguimiento de transformación.	51
Ensayo GUS	51
Ensayo GFP	64
Ensayos histoquímicos para detectar posible HR.	67
Tinción DAB.	67
Prueba NBT.	73
CONCLUSIONES.....	80
APRECIACIONES FINALES.....	81
RECOMENDACIONES.....	82
PRODUCTOS.....	83
BIBLIOGRAFÍA.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático del vector pANIC5B	34
Figura 2. Vista de los cogollos usados y separación de sus hojas.....	41
Figura 3. Preparación del foliolo para el bombardeo.....	41
Figura 4. Foliolos en cámaras húmedas estériles después del bombardeo.....	40
Figura 5. Callo ortet 98.....	41
Figura 6. Callo ortet 106.....	41
Figura 7. Arreglo final del callo en cajas de Petri previo al bombardeo.....	42
Figura 8. Pistola de biobalística empleada en los ensayos.	44
Figura 9. Secuencia de montaje set de biobalística.	47
Figura 10. Eficiencia de cada ensayo de transformación transitoria realizado.....	60
Figura 11. Eficiencia de transformación según el conjunto de condiciones de bombardeo utilizadas.	60
Figura 12. Eficiencia de transformación según el plásmido usado.....	61
Figura 13. Expresión <i>GUSPlus</i> ensayos de transformación # 1 y 2 en callo bombardeado con pANIC5B::GFP	55
Figura 14. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 2 pANIC5B::GFP.....	62
Figura 15. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 3 pANIC5B::GFP.....	62
Figura 16. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 4 pANIC5B::GFP.....	63
Figura 17. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 5 pANIC5B::E5.	60
Figura 18. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 6 pANIC5B::E15.	61
Figura 19. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 7 pANIC5B::E2..	61
Figura 20. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 9 pANIC5B::E2.	62
Figura 21. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 10 pANIC5B::GFP.....	62
Figura 22. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 11 pANIC5B::E2.....	63
Figura 23. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 12 pANIC5B::E19.....	63
Figura 24. Expresión <i>GUSPlus</i> foliolos ensayo de transformación # 13 pANIC5B::E19.....	69

Figura 25. Observación al microscopio de callos bombardeados con pANIC5B::GFP (Ensayo de transformación #1)..	68
Figura 26. Observación al microscopio de callos bombardeados con pANIC5B::GFP (Ensayo de transformación #2)..	69
Figura 27. Observación al microscopio de folíolos bombardeados con pANIC5B::GFP (Ensayo de transformación #2)..	69
Figura 28. Porcentaje de cobertura de peróxido de hidrógeno de la tinción DAB según cada efector bombardeado.....	71
Figura 29. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #4 pANIC5B::GFP.....	72
Figura 30. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #5 pANIC5B::E5.....	72
Figura 31. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #6 pANIC5B::E5.....	71
Figura 32. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #7 pANIC5B::E2.....	72
Figura 33. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #8 AvrPto / Pto.....	72
Figura 34. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #9 pANIC5B::E2.....	73
Figura 35. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #11 pANIC5B::E2.....	73
Figura 36. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #12 pANIC5B::E19.....	74
Figura 37. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #13 pANIC5B::E19.....	74
Figura 38. Porcentaje de cobertura de anión superóxido de la tinción NBT según efector bombardeado..	78
Figura 39. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #4 pANIC5B::GFP..	78
Figura 40. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #5 pANIC5B::E5..	79
Figura 41. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #6 pANIC5B::E5..	79
Figura 42. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #7 pANIC5B::E2.....	77
Figura 43. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #8 AvrPto / Pto.....	77
Figura 44. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #9 pANIC5B::E2.....	78
Figura 45. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación	

transitoria #11 pANIC5B::E2.....	78
Figura 46. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación	
transitoria #12 pANIC5B::E19.....	79
Figura 47. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación	
transitoria #13 pANIC5B::E19.....	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de condiciones físicas usadas en la transformación mediante biobalística en palma de aceite.	35
Tabla 2. Material vegetal usado para cada ensayo de transformación por biobalística realizado.	37
Tabla 3. ADN plasmídico usado en cada ensayo de transformación por biobalística.	43
Tabla 4. Parámetros físicos y biológicos para el bombardeo por biobalística definidos para folíolos de palma de aceite.	45

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

35S T: Secuencia terminadora en pANIC5B.

AcV5: Epítipo en vector pANIC5B.

Amp: Gen de resistencia a ampicilina.

AND / DNA: Ácido desoxirribonucleico.

AVR: Gen de virulencia (del inglés, *Avirulence*).

AVR3a: Efecto o proteína de virulencia de *Phytophthora infestans*.

AvrPto: Efecto o proteína de virulencia de *Pseudomonas syringae*.

C3: Planta con vía metabólica de 3 carbonos.

ccdB: Marcador de selección negativo en vector pANIC5B.

CEPV: Centro Experimental Palmar de la Vizcaína.

CMPG1 ligasa E3: Gen de resistencia.

Cmr: Gen de resistencia a cloranfenicol.

DAB: 3,3'- diaminobenzidina.

Eg: *Elaeis guineensis*.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

ETI: Respuesta inmune asociada a efectores (del inglés *Effector-Triggered Immunity*).

GFP: Proteína verde de fluorescencia (del inglés, *Green Fluorescent Protein*).

GUS: Sistema de gen reportero con la enzima β -glucuronidasa.

GUSPlus: Región codificante gen *GUS* con secuencia de péptido de señal rico en glicina del arroz.

He: Helio.

HPH: Gen de la resistencia a higromicina; *hph*, región codificante higromicina B fosfotransferasa.

HR: Respuesta hipersensible (del inglés, *Hypersensitive Response*).

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario.

Kan: Gen de resistencia a kanamicina.

MAMPs / PAMPs: Patrones moleculares asociados a microorganismos / patógenos (del inglés *Microbe / Pathogen Associated Molecular Patterns*).

MAP-quinasa: Proteína quinasas activada por mitógenos (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*).

NB-LRR: Proteínas de dominios de unión de nucleótidos (NB, del inglés *Nucleotide Binding*) y de repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés *Leucine Rich Repeat*).

NBT: Nitro blue tetrazolio.

NOS T: Secuencia terminadora nos de *Agrobacterium tumefaciens*.

OsAct 1: Promotor e intrón actina 1 de *Oriza sativa*.

OCS T: Secuencia terminadora octopina sintasa.

OxG: Híbrido interespecífico de *Elaeis guineensis* y *Elaeis oleifera*.

PC: Pudrición del cogollo.

PRRs: Patrones de reconocimiento (del inglés *Pattern Recognition Receptors*).

psi: Libra de fuerza por pulgada cuadrada (del inglés, *Pounds-force per Square Inch*).

PTI: Inmunidad desencadenada por PAMPs (del inglés *PAMP-Triggered Immunity*).

Pto: Gen de resistencia a AvrPto.

pUC ori: Origen de replicación *Escherichia coli*

PvUbi1: Promotor e intrón poliubiquitina 1 de *Panicum virgatum*.

PVX: Virus X de la papa (del inglés, *Potato Virus X*).

R: Gen de resistencia (del inglés, *Resistance*).

R1-R2: Sitios de recombinación attR1 y attR2.

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, *Reactive Oxygen Species*).

SAR: Resistencia sistemática adquirida (del inglés, *Systemic Acquired Resistance*).

USDA: Departamento de agricultura de los Estados Unidos (del inglés, *United States Department of Agriculture*).

X-GLUC: Compuesto químico $C_{14}H_{13}BrClNO_7$ sustrato del gen *GUSPlus*.

ZmUbi1: Promotor e intrón ubiquitina 1 de *Zea mays*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, la forma más eficiente de controlar la enfermedad de la pudrición del cogollo (PC) en la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq), consiste en un adecuado manejo fitosanitario, sustentado en estrategias de monitoreo continuo en plantación y detección temprana de la lesión inicial causada por *Phytophthora palmivora* Butler (Sarria et al., 2008). A largo plazo, el estudio y caracterización de germoplasmas silvestres en búsqueda de fuentes de resistencia para esta enfermedad y a futuro, la introgresión de genes de resistencia en materiales comerciales, tienen un carácter prioritario para resolver la problemática fitosanitaria del cultivo de la palma de aceite en Colombia. Lo anterior representa una dificultad en este cultivo ya que no existen fuentes de resistencia comprobadas.

Mientras que los principios conceptuales del sistema inmune en las plantas han sido en su mayoría elucidados, el conocimiento de su organización a nivel de sistema y la dinámica evolutiva de la interfase molecular hospedero-patógeno es aún rudimentario. Llenar esta brecha representa una meta importante en la búsqueda del mejoramiento de cultivos comestibles (Weßling et al., 2014). No obstante, el conocimiento y caracterización funcional de los efectores, aquellas proteínas secretadas por el patógeno durante el desarrollo de la enfermedad y que al ser reconocidas generan una respuesta de defensa en la planta, constituye una herramienta que puede acelerar los procesos de mejoramiento genético al optimizar la caracterización funcional de la resistencia a esta enfermedad. Es por esto que se cree que el estudio de los efectores contribuirá ampliamente al fitomejoramiento clásico y a la ingeniería genética de cultivos de interés comercial (Vleeshouwers & Oliver, 2014). Una de las aproximaciones para estudiar estos efectores o proteínas de virulencia, es lograr su expresión en la planta de interés, y evaluar los efectos de la misma. En este caso, la palma de aceite ha probado ser difícil de transformar mediante métodos tradicionales como, la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, ó, métodos más directos como la agroinfiltración, debido principalmente al tipo de tejido. Es por esta razón, que la biobalística es la opción escogida para establecer un sistema de transformación confiable que podría aplicarse al estudio de estas

moléculas proteínicas. Por tanto, la optimización de los parámetros biológicos y físicos de este tipo de transformación es la clave para llevar a cabo los experimentos que conducirán a la obtención de resistencia genética en esta oleaginosa (Parveez et al., 1997).

En este trabajo se planteó evaluar la expresión de tres efectores de *P. palmivora* que hacen parte de la interacción de este patógeno con la palma de aceite durante el comienzo de la enfermedad. Se estandarizó una metodología de expresión transitoria en dos cultivares de palma de aceite a través de un ensayo mediado por biobalística. La cual consiste en observar la respuesta hipersensible (HR, del inglés *Hypersensitive Response*), que se puede generar en el tejido bombardeado, a partir de la expresión transitoria del gen que codifica para la proteína de virulencia evaluada. Esta metodología podría ser utilizada a futuro en la selección de diferentes germoplasmas silvestres mediante una aproximación efectorómica. Teniendo en cuenta lo anterior, se diseñó la siguiente pregunta: ¿Es posible evaluar la expresión de tres efectores de *P. palmivora* en palma de aceite mediante expresión transitoria, en aras de acelerar el proceso de obtención de materiales resistentes?, y es sobre esta misma que se enmarca el trabajo.

JUSTIFICACIÓN

La especie *Elaeis guineensis* Jacq. es nativa de África central y occidental, y es la más importante para la industria de aceite de palma. Su cultivo es uno de los de mayor proyección mundial y nacional, ya que compone la mayor fuente de aceite vegetal en el mundo, con una producción de casi 45 millones de toneladas, lo que cuenta por más del 26% de la producción de aceites comestibles globales (Arias et al., 2013). En Colombia, desde el año 2002 se ha venido registrando un incremento anual en áreas cultivadas de casi el 11%. El país ha sido pionero en la siembra de palma de aceite en América, pero este liderazgo puede verse amenazado por enfermedades catastróficas que afectan el cultivo, dentro de las cuales sobresale la pudrición del cogollo (PC), por su efecto directo sobre la producción y rentabilidad del cultivo (Sarria et al., 2008; Martínez et al., 2010).

Las condiciones ambientales tales como las lluvias continuas con ausencia de un período seco prologado, sumado a la poca diversidad genética de los materiales sembrados favorecen las explosiones de su agente causal, el oomicete *Phytophthora palmivora* (Martínez et al., 2010). Esta enfermedad está presente en todas las zonas palmeras del país, y es responsable de los bajos rendimientos y de la desaparición de miles de hectáreas del cultivo en varias zonas productoras (Martínez, 2009); lo que causa impactos negativos tanto económicos como sociales dentro de las comunidades palmicultoras (Sarria et al., 2008).

Una de las principales tareas en el futuro inmediato, es el desarrollo de métodos que permitan tamizar los materiales vegetales disponibles para identificar su susceptibilidad, tolerancia o resistencia a la enfermedad (Torres et al., 2010). Como ayuda para la distinción de genes de resistencia en la palma de aceite, surge el estudio de los efectores, entendiéndose estos como proteínas que se encuentran involucradas en el proceso de la interacción planta-patógeno. Los efectores que demuestran ser importantes para la virulencia proveen de un conocimiento útil para el mejoramiento, y suministran blancos ideales de genes de resistencia (R) de mayor durabilidad y de más amplio espectro (Vleeshouwers et al., 2008). Para

obtener pistas de estos procesos moleculares, los modos de acción de cada efector y sus interacciones con los receptores de inmunidad en la planta deben ser estudiados a profundidad (van der Hoorn & Kamoun, 2008). El reto se compone entonces de optimizar las pruebas de funcionalidad de las plantas hospederas. Para solanáceas, el ensayo transitorio basado en *Agrobacterium* ha sido efectivo; sin embargo, para cultivos de monocotiledóneas estos análisis se ven limitados. Lo anterior constituye una limitante para explotar los efectores de distintos patógenos (Vleeshouwers & Oliver, 2014).

En este orden de ideas, se hace necesario la implementación de un sistema de transformación confiable que represente una plataforma de experimentación para la caracterización de los efectores producidos por *P. palmivora*. Evangelisti y colegas (2017), reportaron un catálogo de 224 proteínas efectoras candidatas de *P. palmivora*, las cuales pueden ser usadas en la aproximación efectorómica. Lo anterior consiste en la selección de algunas de estas proteínas, para hacer un tamizaje de cultivares, y posteriormente, identificar genes de resistencia contra este patógeno, lo cual permite el mejoramiento del cultivo de palma de aceite en un futuro. Como se mencionó anteriormente, este método no puede estar basado en *Agrobacterium*, sino en otro tipo de tecnología de ADN recombinante, para el caso de la palma de aceite, la mejor aproximación es el uso del bombardeo de micopartículas, la cual ya ha probado ser exitosa en numerosas investigaciones que han requerido la transformación estable y transitoria de la planta. No obstante, la expresión transitoria de proteínas de virulencia de *P. palmivora* en tejido foliar de palma de aceite es una aproximación que aún no se ha abordado.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar los parámetros y condiciones de la transformación por medio de biobalística en palma de aceite, para evaluar la expresión transitoria de proteínas de virulencia de *Phytophthora palmivora* mediante ensayos histoquímicos.

Objetivos específicos

- Normalizar los parámetros físicos y biológicos del bombardeo por biobalística para garantizar una transformación transitoria exitosa en folíolos de palma de aceite.
- Estimar la eficiencia de la transformación transitoria en folíolos de palma de aceite mediante técnicas histoquímicas.
- Evaluar la respuesta de la expresión transitoria de tres proteínas de virulencia de *Phytophthora palmivora* sobre dos materiales de palma de aceite mediante ensayos histoquímicos.

MARCO TEÓRICO

Desde su centro de origen en África occidental, la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) se ha propagado, a nivel industrial, a través de los trópicos y se siembra ahora en más de 16 países. Su cultivo es una industria en continua expansión y crecimiento a nivel mundial. Esto se debe a la versatilidad que tiene su aceite, ampliamente utilizado para la manufactura de alimentos, cosméticos y plásticos, y más recientemente en la industria energética, siendo una fuente importante de biocombustibles (Basiron, 2005). A diferencia de otros cultivos de oleaginosas de importancia económica como la soya, el maíz, la canola o el girasol, la palma de aceite es una planta perenne, de tardío y largo rendimiento cuyo ciclo de productividad económica puede durar hasta 30 años. Además, es un cultivo altamente rentable, produciendo siete veces más la cantidad de aceite por hectárea que otros cultivos de este tipo (Basiron, 2007). Con el aumento de la población y de la demanda de los productos derivados del aceite, la expansión del cultivo es predecible; por lo que su crecimiento debe ser económicamente viable y sostenible ambientalmente (Wahid et al., 2004).

En Colombia, este cultivo ha venido creciendo a ritmos cercanos al 10% por año y el área sembrada actual corresponde a más de 400.000 ha distribuidas en 16 departamentos y 100 municipios, generando 42.120 empleos directos, 63.180 empleos indirectos y contribuyendo ampliamente al crecimiento del empleo rural (Sarria et al., 2008; Torres et al., 2010).

Sin embargo, la pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite aparece como la enfermedad más limitante no sólo en Colombia sino también en toda la América tropical. El agente causal permaneció desconocido por cerca de un siglo, pero las investigaciones recientes permitieron identificar al patógeno *Phytophthora palmivora* Butl., como el responsable de iniciar el proceso infectivo (Sarria et al., 2008; Torres et al., 2010). Este eucariota pertenece al reino Straminipila (Cromista), a la clase Oomycetes, y posiblemente tiene su origen en el trópico americano. Las temperaturas entre 27 y 30°C, alta humedad relativa y baja radiación solar favorecen

su desarrollo. En las diferentes zonas palmeras de Colombia la enfermedad ha devastado miles de hectáreas, causando pérdidas que ascienden los 5,5 billones de pesos (Drenth et al., 2013). No obstante, la incidencia y severidad no es la misma en todas las zonas y existen claras evidencias de recuperación de las palmas enfermas en algunos casos (Martínez, 2009).

Los esfuerzos para generar estrategias de control contra la PC, son medidas usualmente paliativas. La única solución duradera a esta importante enfermedad es el uso de materiales resistentes, sin embargo, aún no existen fuentes comprobadas de resistencia en la palma africana (Benítez & García, 2015). Una alternativa para agilizar el hallazgo de genes de resistencia radica en el conocimiento y caracterización de los efectores, proteínas que el patógeno usa para evadir las defensas de la planta y manipular su metabolismo. Estas proteínas han sido usadas directamente para seleccionar germoplasmas más resistentes en solanáceas. Usar este tipo de aproximaciones en palma de aceite requiere de un conocimiento base sobre los efectores que son importantes en la interacción *P. palmivora* - palma de aceite, así como estandarizar una herramienta basada en transformación genética para lograr la expresión transitoria de estas proteínas en la palma. Lo anterior permitiría, a largo plazo, la caracterización de la resistencia en colecciones de germoplasmas tanto silvestres como comerciales.

Palma de aceite y su cultivo.

La palma de aceite africana es un cultivo tropical, perenne y herbáceo de zonas bajas, no mayores a 500 m.s.n.m. Crece de forma óptima a 28°C, humedad relativa alrededor de 56% y condiciones de riego constante, equivalentes a los 1800-2000 mm anuales. La planta es una monocotiledónea de la familia Arecaceae que posee un único punto de crecimiento del cual emerge una secuencia regular de entre 20 y 26 hojas anuales (Basiron, 2005). Es monoica, y las inflorescencias masculina y femenina son producidas en diferentes estados en ciclos temporales que duran alrededor de un año, de esta manera, se garantiza el cruzamiento natural. Sin

embargo, el autocruzamiento, a través de la autopolinización es posible en condiciones controladas (Mayes et al., 1997).

A pesar de ser una planta C3, la palma de aceite posee la distinción de ser el cultivo oleaginoso más productivo de todos, con un promedio de productividad de 4,4 Ton/ha/Año (Wahid et al., 2004). Actualmente, el aceite de palma lidera la producción mundial de aceites y grasas, con un 24% del total, ubicándose por encima de la producción de aceite de soya y canola. En contraste, el rendimiento de otros cultivos de aceite es de menos de una Ton/ha/Año. Esto significa, que tan sólo siete millones de ha de palma de aceite son requeridas para suministrar el 20% de la demanda de aceites y grasas mundial, en comparación con los 80 millones de ha de semillas oleaginosas que se necesitarían para llenar 24% de esta demanda (Murphy, 2003).

Adicionalmente, esta palma también produce 0,5 Ton/ha/Año de aceite de palmiste. Ambos tipos de aceite (mesocarpio y palmiste), difieren en su composición de ácidos grasos y poseen diferentes usos. Del mesocarpio del fruto, se extrae el aceite crudo de palma utilizado principalmente en la industria alimentaria y como materia prima de oleoquímicos. Su uso para la producción de biodiesel es un área en creciente desarrollo en Colombia y en el mundo (Carter et al., 2007). El aceite de palmiste, proviene de la almendra y tiene un uso preferente en la fabricación de jabones, cosméticos y productos de limpieza e industria oleoquímica en general. También, se obtiene la torta de palmiste, resultante del prensado mecánico de la almendra de palma y utilizado principalmente en alimentación animal (Bernal, 2001).

Según reportes al 2017 del USDA (<https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>), la lista de países con la mayor producción de aceite de palma está liderada por Indonesia con 36.000 mil toneladas métricas, seguido por Malasia con 21.000 y en un cuarto lugar Colombia, con 1.320 mil toneladas métricas.

Elaeis guineensis es la especie comercialmente cultivable en todos los países dedicados a la agroindustria de la obtención de aceite de palma. De manera adicional, en Colombia, la siembra del híbrido interespecífico resultado del

cruzamiento de esta especie con la especie cercana, la palma americana *Elaeis oleífera* [H.B.K.] Cortés, también se ofrece como una alternativa de producción comercial. Lo anterior, por ser la única opción de recuperar plantaciones afectadas por la pudrición del cogollo mediante la siembra de materiales híbridos que exhiben resistencia parcial (Betancourth et al., 2011; Martínez, 2009; Meunier, 1991).

Pudrición del cogollo.

La enfermedad denominada pudrición de cogollo (PC), ha tenido un alto impacto en la industria de la palma de aceite en Colombia y otros países de Suramérica. Ha causado pérdidas en Colombia de hasta el 50% de la producción por un valor de 5,5 billones de pesos y ha devastado grandes proporciones del cultivo, estimadas en 70.000 ha. De hecho, la situación de la palma de aceite debido a la PC ha alcanzado niveles críticos declarándose el estado de emergencia fitosanitaria en el 2013 en los municipios de Barrancabermeja, Puerto Wilches, Sabana de Torres y San Vicente de Chucurí (Santander), y, Cantagallo y San Pablo (Bolívar), en dónde la enfermedad superó una incidencia del 70% (Resolución ICA 002103 de 2013).

La enfermedad afecta el cogollo o corazón de la palma justo sobre la región meristemática. El primer síntoma externo es visible cuando emergen las flechas y se presentan pequeñas lesiones caracterizadas por la desintegración del tejido entre los haces vasculares. Si las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad, 26°C y 80% de humedad relativa, se da un incremento en el número y tamaño de las lesiones, llegando a afectar toda la flecha. La patogénesis continúa y el proceso de pudrición destruye todos los nuevos tejidos que se están formando y finalmente afecta la zona meristemática (Ariza et al., 2008). Como resultado, una palma adulta enferma pierde sus tejidos nuevos, y solo permanecen verdes las hojas que se formaron antes de la infección (Martínez et al., 2010). Dependiendo de la cantidad del tejido infectado y si esta alcanza o no el meristemo, la PC puede ser letal o una enfermedad que tan sólo inhibe el crecimiento de la palma por algún periodo de tiempo (Benítez & García, 2015).

El patógeno causa daños directos e indirectos. Aunque inicialmente la PC es firme y seca, rápidamente el tejido enfermo es invadido por bacterias del género *Erwinia* y hongos como *Thielaviopsis paradoxa* y *Fusarium* spp. tornándose blanda y húmeda, lo que empeora la condición de la palma (Sarria et al., 2008).

En el año 2008 se logra identificar por primera vez el agente causal de la PC (Sarria et al., 2008). A partir de este momento la detección temprana de la lesión causada por *Phytophthora palmivora* en la hoja flecha y posterior remoción (cirugía) del tejido meristemático afectado, se constituye en la única alternativa eficaz de manejo fitosanitario. Sin embargo, la falta de información sobre la biología de la infección de *P. palmivora* en palma de aceite, particularmente la identificación de factores de virulencia como las proteínas efectoras, es una gran limitante al momento de buscar estrategias que permitan avanzar en la búsqueda de fuentes de resistencia genéticas durables.

Debido a la alta incidencia de la enfermedad a lo largo del tiempo, aun cuando se han aunado esfuerzos para contener la PC mediante prácticas agronómicas adecuadas, se presume que la única solución duradera es el uso de materiales resistentes. Sin embargo, hasta ahora no existen fuentes comprobadas de resistencia a la enfermedad en la palma africana (Basiron, 2005). Aunque existe una colección caracterizada de germoplasma silvestre de *E. guineensis* disponible para la búsqueda de fuentes de resistencia (Arias et al., 2013), se estima que los métodos de mejoramiento vegetal tradicionales podrán tomar un esfuerzo considerable en tiempo y dinero debido a la naturaleza perenne del cultivo.

Generalidades de *Phytophthora palmivora*

Phytophthora palmivora Butler (1917), es un oomicete fitopatógeno ubicuo con un amplio rango de hospederos, infecta cerca de mil especies de plantas incluyendo plantas ornamentales y cultivos agrícolas (Erwin & Ribeiro, 1996). Es causante de algunas de las pudriciones más severas en cultivos de importancia como palma de aceite africana (*Elaeis guineensis*), cacao (*Theobroma cacao*), caucho (*Hevea*

brasiliensis), coco (*Cocos nucifera*), papaya (*Carica papaya*), pimienta negra (*Piper nigrum*), durian (*Durio zibethinus*), el árbol del pan (*Artocarpus altilis*), piña (*Ananas comosus*) y cítricos (Erwin & Ribeiro, 1996; Elliott & Uchida, 2004).

Las condiciones ambientales que favorecen la infección y severidad de las enfermedades causadas por este oomicete se encuentran principalmente en regiones húmedas tropicales, con temperaturas entre 20-30°C, alta humedad relativa y baja radiación solar (Christen & Hohl, 1972).

P. palmivora se diferencia de otras especies del género tanto en su morfología como en sus características genéticas y fisiológicas. Tiene un ciclo de vida muy complejo, con diferentes formas, desde zoosporas con paredes celulares muy gruesas, hasta estructuras de supervivencia. Produce abundantes esporangios que se separan fácilmente del esporangióforo, distinguiéndose en que son visiblemente papilados, con un pedicelo corto, principalmente elipsoides u ovoides, y con un tamaño promedio de 37,1 μm x 52, μm (Drenth & Sendall, 2001; Martínez et al., 2010). Esta especie se caracteriza por la presencia de clamidosporas, principales estructuras de supervivencia, con un diámetro promedio de 42,4 μm y que son observables en el avance de las lesiones en tejido enfermo (Sarria et al., 2008; Torres et al., 2010; Martínez et al., 2010).

En Colombia *P. palmivora* se ha reportado causando la pudrición de la raíz y del fruto en papaya, la mazorca negra en cacao, la raya negra en caucho y la PC en palma de aceite (Torres et al., 2010). Por lo tanto, conocer la biología de este importante patógeno no solo beneficiaría a la agroindustria palmicultora, sino otros cultivos de la industria nacional. Adicionalmente, la implementación de aproximaciones como la efectorómica para la búsqueda de fuentes de resistencia en palma de aceite sería un gran avance en la selección de germoplasma de interés con fines de mejoramiento vegetal. Lo anterior, al agilizar los procesos de selección de parentales y progenies a evaluar, reduciendo el número de ciclos de mejoramiento que típicamente llevarían entre 10 y 15 años (Mayes et al., 1997).

Interacciones moleculares planta-patógeno.

Una de las preguntas más importantes en fitopatología, consiste en cómo los microorganismos eucariotas pueden manipular el metabolismo y las defensas de su huésped para colonizarlo. Las plantas, por un lado, han evolucionado para crear un sistema de defensa que detecta la mayoría de patógenos potenciales y la defiende de los mismos (Jones & Dangl, 2006). Dicho sistema de defensa abarca las barreras preformadas, la inmunidad celular innata en respuesta a elicitores generales (Belhaj et al., 2017), y, como última opción, la resistencia mediada por acciones simultáneas e independientes de genes tanto del patógeno (avr, del inglés *Avirulence*) como de la planta (R, del inglés *Resistance*) (Thordal-Christensen, 2003; Zhang et al., 2011). Por otro lado, los patógenos eucariotas, no solamente presentan el desarrollo de estructuras de infección especializadas, la producción de toxinas, la secreción de enzimas hidrolíticas, o la detoxificación de compuestos antimicrobianos (Talbot, 2003; Randall et al., 2005); sino que adicionalmente, se ha descubierto que de manera similar a las bacterias usan un arsenal de proteínas, llamadas efectores, que modulan la inmunidad innata de la planta, permitiendo su colonización y reproducción (Catanzariti et al., 2007; Kamoun, 2007).

En un primer lugar, la entrada de los patógenos se ve restringida por barreras físicas como la cutícula cerosa y la pared celular, y por respuestas de defensa inducidas como la producción de enzimas antimicrobianas y de metabolitos secundarios (Thordal-Christensen, 2003). Estos metabolitos secundarios corresponden principalmente a especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el oxígeno molecular (O_2) (Wojtaszek, 1997). El estallido de las mismas contribuye a diversas respuestas de defensa como: la acción antimicrobiana directa, la formación de lignina, la modificación de la pared celular (haciéndola más rígida mediante la adición de polímeros como proteínas), y la producción de fitoalexinas (Daudi et al., 2012); además, dan origen a la respuesta hipersensible localizada (HR, del inglés *Hypersensitive Response*), actúan como segundos señalizadores para inducir la expresión de genes relacionados con la defensa (Jabs et al., 1997; Wang et al.,

2007) y desencadenan la resistencia sistemática adquirida (SAR, del inglés *Systemic Acquired Resistance*) (Wang et al., 2010; Baxter et al., 2014; Uma & Podile, 2015).

En segundo lugar, la defensa de la planta se vale de la inmunidad celular innata, la cual es mediada por receptores de patrones de reconocimiento (PRRs, del inglés *Pattern Recognition Receptors*), que se localizan en la superficie de la membrana celular donde perciben señales de los patógenos durante la interacción con el hospedero. Estas señales son denominadas patrones moleculares asociados a microorganismos/patógenos (MAMPs/PAMPs, del inglés *Microbial/Pathogen Associated Molecular Patterns*) (Dodds & Rathjen, 2010; Win et al., 2012). Los MAMPs/PAMPs son estructuralmente conservados y se consideran componentes o productos indispensables del ciclo de vida del patógeno y de su proceso infectivo. El reconocimiento entre PRRs y PAMPs, por medio de los dominios apoplásticos de estos receptores, resulta en la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI, del inglés *PAMP-Triggered Immunity*), la cual puede detener la colonización del patógeno (Jones & Dangl, 2006; Henry et al., 2012). La PTI incluye la alcalinización del pH, la formación de papilas (estructuras locales de la pared celular con diferentes deposiciones como calosa, proteínas y fenoles), la acumulación de calosa, la activación de enzimas MAP quinasas, la producción de ERO, cambios en la expresión génica y el reforzamiento de la pared celular (Morel & Dangl, 1997; Zipfel, 2008; Zhang et al., 2011).

Por otra parte, los efectores, aquellas moléculas secretadas por el patógeno que alteran la función y estructura de las células del hospedero (Win et al., 2012), funcionan primordialmente en la virulencia, suprimiendo las respuestas de inmunidad (Whisson et al., 2007; Dou et al., 2008a). A lo anterior se le denomina interacción compatible y se da ya que no hay un reconocimiento de estos efectores por parte del hospedero, permitiendo al patógeno establecerse y lograr generar la enfermedad. Sin embargo, si los productos de genes de resistencia de las plantas (R) reconocen los productos de genes de virulencia de patógenos (avr); este reconocimiento causará la activación de una cascada de genes de la planta

resultante en mecanismos de defensa que incluyen la muerte celular controlada alrededor del sitio de infección (HR), deteniendo así la expansión del patógeno. Este tipo de interacción se denomina incompatible y se caracteriza por la especificidad en el reconocimiento entre los productos del gen R (receptor) y del gen avr. Cuando la reacción es compatible, se denominan efectores a las moleculares secretadas por el patógeno; pero cuando hay reconocimiento de estos por parte de los genes de resistencia de la planta (R) se llaman avr o genes de avirulencia (Wang et al., 2007; Oh et al., 2009; Jones and Dangl, 2006; He et al., 2007).

En esencia, se tienen dos ramas del sistema inmune en plantas, una usa los PRRs transmembranales que responden a MAMPs/PAMPs conservados. Y la segunda, actúa ampliamente dentro de la célula, usando las proteínas NB-LRR de la mayoría de genes R (Dangl & Jones, 2001). Estos se denominan así, debido a los dominios de unión de nucleótidos (NB, del inglés *Nucleotide Binding*) y de repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés *Leucine Rich Repeat*). Los efectores de diversos patógenos son reconocidos por las proteínas NB-LRR y este reconocimiento desencadena la respuesta inmune asociada a efectores (ETI, del inglés *Effector-Triggered Immunity*), que produce una muerte celular controlada visible o HR (Fawke et al., 2015) como se mencionó anteriormente. Este tipo de resistencia es efectiva contra patógenos con ciclos de vida biotróficos o hemibiotróficos, pero no para aquellos que durante la colonización producen muerte a los tejidos hospederos (necrotróficos) (Glazebrook, 2005; Jones & Dangl, 2006).

Efectores y efectorómica.

Los efectores son proteínas de virulencia secretadas y/o traslocadas al hospedero. Típicamente son proteínas modulares en donde la región N-terminal posee la secuencia necesaria para la translocación al interior de la célula vegetal y la C-terminal posee la región propiamente efectora (Whisson et al., 2007). Los efectores están involucrados en los procesos de colonización y proliferación del patógeno

(Deslandes & Rivas, 2012), jugando un papel importante en la supresión de defensas del hospedero (Jamir et al., 2004; Wang & Huang, 2011).

Los efectores de los oomicetes caen en dos amplias categorías: los apoplásticos, que se acumulan en los espacios intercelulares de la planta y los citoplasmáticos, que son translocados directamente a la célula vegetal a través de una estructura de infección especializada llamada haustorio (Whisson et al., 2007).

Una alternativa en la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia es explotar la información del patógeno, particularmente las proteínas que son secretadas y que interfieren con la respuesta de defensa de la planta ayudando a la proliferación del patógeno y a establecer la enfermedad, es decir, los efectores. La efectorómica reúne el estudio de dichos efectores y se define como una aproximación genómica funcional y de alto rendimiento para explorar germoplasmas de plantas y detectar genes de resistencia, aportando así grandes contribuciones a los programas de mejoramiento (Du & Vleeshouwers, 2014). Esta estrategia fue pionera en *Phytophthora infestans* y el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), donde este oomicete es el mayor causante de las pérdidas en esta planta (Kamoun et al., 2012; Vleeshouwers et al., 2008). A partir de estos estudios, fue posible establecer que, en la infección temprana, el efector AVR3a es secretado por el haustorio de *P. infestans* y translocado a la célula hospedera (Whisson et al., 2007). Luego, estabiliza la proteína CMPG1 ligasa E3, mediando así la supresión de la muerte celular inducida (Bos et al., 2010).

Además de servir como marcadores moleculares para la selección asistida, los efectores son vistos actualmente como marcadores funcionales que aceleran y optimizan el mejoramiento genético. Las ventajas de su estudio, es decir, de la efectorómica pueden ser resumidas en cuatro aspectos (Vleeshouwers & Oliver, 2014):

- Acelerar la identificación de genes de resistencia.
- Ayudar a seleccionar proteínas R con rangos de especificidad diferentes para pirimidación.

- Certificar material resistente.
- Asistir la implementación de líneas resistentes en campo.

Para que la aplicación de la efectorómica pueda ser expandida en otros patosistemas (e.g. *P. palmivora*-Palma de aceite) se requieren flujos de trabajo genómico y transcriptómico que generen más conocimiento sobre los repertorios de efectores (Pais et al., 2013). Aproximaciones como la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* o la agroinfección con PVX (virus X de la papa) han resultado exitosas casi que exclusivamente en solanáceas, debido principalmente a limitantes en otras plantas como el desconocimiento de los repertorios de efectores, la falta de datos de expresión de efectores durante la interacción con el hospedero, la evidencia de la funcionalidad de los efectores y su papel en la virulencia del patógeno. A lo anterior se suma la carencia de ensayos funcionales para plantas hospederas como leguminosas y monocotiledóneas. Es por esta razón que los ensayos de biobalística están siendo explotados para expresar *in planta* efectores de varios patógenos (Qutob et al., 2002; Dou et al., 2008a). Esta metodología podría permitir extender la efectorómica a la palma de aceite y a un amplio rango de plantas hospederas. Adicionalmente para el caso de *P. palmivora* la perspectiva parece mejorar ya que se han identificado varios genes que podrían codificar proteínas efectoras en aislamientos colombianos del patógeno (Schornack, 2016; Evangelisti et al., 2017).

Transformación genética en plantas.

Existen diversos métodos de transformación genética, y estos pueden dividirse en dos grupos: directos e indirectos. Los métodos indirectos se basan en la introducción del transgén mediante el uso de vectores biológicos como *Agrobacterium*. Los métodos directos no usan células bacterianas como intermediarios, sino que mediante mecanismos físicos y químicos se introduce el ADN en la célula, los más aplicados dentro de este grupo son la transformación de protoplastos y el bombardeo de micropartículas (Rao et al., 2009).

La biobalística es un proceso por el cual micropartículas cubiertas con ADN son aceleradas por un gas comprimido y disparadas sobre los tejidos vegetales a altas velocidades, atravesando la pared y la membrana celular, llevando al interior de la célula los genes de interés para su posterior integración en el genoma vegetal (Sanford, 2000). Este sistema de transformación requiere de un dispositivo mecánico (pistola) que permita el bombardeo, actualmente funciona mediante el sistema de helio (He) comprimido que brinda una óptima regulación de la fuerza, distribución de microproyectiles y reproducibilidad entre bombardeos. Esta pistola logra velocidades de más de 400 m/s en un vacío moderado para evitar el rozamiento con el aire, condiciones que las células vegetales soportan durante uno o dos minutos (Díaz & Chaparro-Giraldo, 2012). Las micropartículas empleadas son microesferas, elaboradas de materiales densos, como el oro o tungsteno, de diámetro variado y longitudes desde 0,5 a 3 μ m. Este método fue ideado en la década de 1980, por un grupo de investigadores de la Universidad de Cornell (E.E.U.U.) e introducido por Sanford et al. (1987). La ventaja de este método, es que con un disparo es posible producir múltiples integraciones (Díaz & Chaparro-Giraldo, 2012).

Para introducir el transgén deseado, es necesario que el mismo sea incorporado previamente en un vector. Los vectores pANIC pertenecen a un grupo de plásmidos creados para el mejoramiento genético de plantas monocotiledóneas. En concreto, el vector pANIC5B (Figura 1) está diseñado para el bombardeo de micropartículas y contiene: un casete de sobreexpresión de la secuencia diana (attR1-Cmr-ccdB-attR2). Un casete de selección de la planta que confiere resistencia a higromicina (*hph*). Y un gen reportero visual, el gen *GUSPlus*, flanqueado por el promotor de la ubiquitina 1 de *Panicum virgatum* (Mann et al., 2012). El gen *GUS* codifica para la enzima β -glucoronidasa, la cual cataliza el sustrato conocido como X-Gluc, cuyo producto de degradación es un precipitado de color azul índigo.

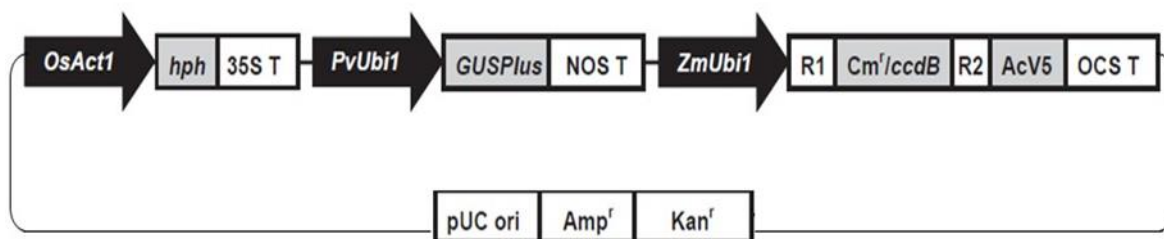


Figura 1. Diagrama esquemático del vector pANIC5B

Abreviaciones: **OsAct1**, promotor e intrón actina 1 de *Oriza sativa*. **PvUbi1**, promotor e intrón poliubiquitina 1 de *Panicum virgatum*. **ZmUbi1**, promotor e intrón ubiquitina 1 de *Zea mays*. **hph**, región codificante higromicina B fosfotransferasa. **GUSPlus**, región codificante *GUSPlus* con secuencia de péptido de señal rico en glicina del arroz. **Cmr**, gen de resistencia a cloranfenicol. **ccdB**, marcador de selección negativo. **35S T**, secuencia terminadora. **NOS T**, secuencia terminadora nos de *Agrobacterium tumefaciens*. **OCS T**, secuencia terminadora octopina sintasa. **AcV5**, epítipo. **R1** y **R2**, sitios de recombinación attR1 y attR2. **pUC ori**, origen de replicación *Escherichia coli*. **Amp** y **Kan**, resistencia a ampicilina y kanamicina. Tomado de Mann et al., 2012.

La metodología más utilizada para adherir este casete de expresión a las micropartículas, consiste en precipitar el ADN empleando cloruro de calcio y espermidina (Sanford, 2000; Altpeter et al., 2005; Rao et al., 2009). Después del bombardeo, el ADN se desprende de los microproyectiles, dadas las modificaciones del entorno iónico (Díaz & Chaparro-Giraldo, 2012).

Expresión transitoria en palma de aceite.

Debido a que la palma de aceite es una planta monocotiledónea, no es fácilmente transformable mediante *Agrobacterium tumefaciens*, probando ser un método ineficiente en este tipo de plantas (Rao et al., 2009). Por otro lado, los ensayos de expresión no pueden realizarse mediante agroinfiltración dado el tipo de tejido de las hojas de la palma. Por esto, se hace necesario emplear otro sistema de transformación transitoria. El método del bombardeo de partículas se ha venido

desarrollando y es ahora usado de manera rutinaria en la transformación de palma de aceite (Parveez et al., 2000). Sin embargo, la introducción de genes extraños en células vegetales requiere de la optimización de parámetros físicos y biológicos que afectan la entrada del ADN. En la Tabla 1 se puede ver un resumen de dichos estudios realizados en palma de aceite y las diferentes condiciones físicas usadas en la transformación por biobalística.

Tabla 1. Comparación de condiciones físicas usadas en la transformación mediante biobalística en palma de aceite.

Presión de He (psi)	Distancia Disco de ruptura-Macrocarrier (mm)	Distancia Malla de detención-Objetivo (mm)	Presión de vacío	Tejido	Ensayos de confirmación	Referencia
1100	6	75	NR	Callo	Análisis histoquímico GUS. Análisis fluorométrico MUG.	Chowdhury <i>et al.</i> , 1997.
450 650 900 1100 1300 1550 1800 2000 2200	3 6 9	60 75 90 105 120 150	27 inHg 28 inHg 29 inHg	Callo	Análisis histoquímico GUS.	Parveez <i>et al.</i> , 1997.
1350 1550	11	60 90	27 Hg	Foliolo Raíz Mesocarpio	Análisis histoquímico GUS. Análisis fluorométrico MUG. Ensayo fluorescencia GFP.	Zubaidah & Siti Nor Akmar, 2003
1100 1550	6	60	27 Hg	Frutos Foliolo Raíz	Análisis histoquímico GUS. Ensayo fluorescencia GFP.	Omidvar <i>et al.</i> , 2008.
1100	6	75	67,5 mmHg	Callo	Ensayo GUS	Parveez & Bahariah, 2012.
1100	6	75	67,5 mmHg	Callo	Ensayo GUS	Bahariah <i>et al.</i> , 2013.

1100	NR	6	26 inHg	Callo	Ensayo GFP	Masani, 2013.
------	----	---	---------	-------	------------	---------------

El principio básico del método de biobalística consiste en lanzar microproyectiles saturados con ADN a altas velocidades para penetrar las capas externas del tejido e introducir el material genético en el citoplasma de células vivas, que se espera, luego, sobrevivan y puedan expresar el gen deseado. Sin embargo, obtener altas tasas de expresión del gen deseado requiere de una optimización inicial de los parámetros de la transformación. Dichos parámetros, tanto físicos como biológicos, han sido estandarizados para la transformación genética estable principalmente de callo en palma de aceite (Chowdhury et al., 1997; Parveez et al., 1997; Parveez, 2000; Zubaidah & Siti Nor Akmar, 2003; Abdullah et al., 2005), pero no en folíolos. No obstante, en palma de aceite se han realizado estudios sobre la expresión transitoria en tejidos como hojas, frutos y raíces, los cuales han sido exitosamente implementados, facilitando el estudio puntual de promotores tejido-específicos (Omidvar et al., 2008). En algunos casos, como en el callo embriogénico, las condiciones para la introducción de ADN han sido optimizadas eficazmente basándose en la expresión transitoria del gen *GUS* (Chowdhury et al., 1997). Aunque en palma de aceite nunca se ha utilizado una aproximación efectorómica, el estudio de las proteínas efectoras en numerosos patosistemas se ha llevado a cabo *in vivo* utilizando expresión transitoria a través de biobalística (Kale & Tyler, 2011), por lo cual la caracterización de las proteínas efectoras de *P. palmivora* puede ser alcanzable a través de este sistema en palma de aceite.

METODOLOGÍA

Para el cumplimiento de los objetivos trazados anteriormente se describirá de forma general las metodologías empleadas para su cumplimiento, así como, los resultados obtenidos tras cada procedimiento. Los detalles de los procedimientos a continuación descritos son propiedad intelectual de CENIPALMA.

Material vegetal.

Para los ensayos de transformación se usaron callos y folíolos de hojas negativas de palmas adultas. Se utilizaron cultivares de palma de aceite con susceptibilidades contrastantes a la pudrición del cogollo (PC); *Elaeis guineensis* como susceptible y el híbrido interespecífico de *E. guineensis* y *Elaeis oleífera*, (OxG) como menos susceptible. Los cogollos empleados se obtuvieron de palmas del Centro Experimental Palmar de la Vizcaína (CEPV-Santander), excepto los usados en el ensayo de transformación transitoria 11, los cuáles fueron traídos desde una plantación en Tumaco (Nariño); la información sobre los cogollos usados se refleja en la Tabla 2.

Tabla 2. Material vegetal usado para cada ensayo de transformación por biobalística realizado.

Ensayo de transformación	Cultivares	Tejido
1	Ortet 98	Callo
	Ortet 106	Callo
2	Ortet 98	Callo
	Ortet 106	Callo
	<i>E. guineensis</i> Cód 36	Hoja
3	<i>E. guineensis</i> Cód 36	Hoja
4	<i>E. guineensis</i> Cód 36	Hoja
	OxG Cód. 25	Hoja

5	<i>E. guineensis</i> Cód.36	Hoja
6	OxG Cód. 25	Hoja
	<i>E. guineensis</i> Cód.36	Hoja
7	OxG Cód. 25	Hoja
	<i>E. guineensis</i> Cód. 36	Hoja
8	OxG Cód. 25	Hoja
	<i>E. guineensis</i> Cód. 36	Hoja
9	OxG Cód. 25	Hoja
	<i>E. guineensis</i> Cód. 36	Hoja
10	OxG Cód. 25	Hoja
	<i>E. guineensis</i> Cód. 36	Hoja
11	OxG T10	Hoja
	OxG T10	Hoja
12	OxG Cód. 25	Hoja
	<i>E. guineensis</i> Cód. 36	Hoja
13	OxG Cód. 25	Hoja
	<i>E. guineensis</i> Cód. 36	Hoja

La preparación de los foliolos para el bombardeo y su tratamiento luego del mismo se describen a continuación:

1. Poner el cogollo de la palma sobre papel kraft (Ver Figura 2 A y B).
2. Desinfectar el cogollo con alcohol 70%.
3. Abrir el cogollo con cuidado, separando e identificando cada hoja con ayuda del cuchillo (Ver Figura 2 C).
4. Tomar la hoja, cortar un trozo, con el escalpelo #4; y envolverlo en papel aluminio. Llevar a la cabina de seguridad biológica.
5. Escoger los foliolos y cortarlos en longitudes iguales sobre toallas de papel estériles con el escalpelo #4 (Ver Figura 3 A y B).
6. Tomar estos foliolos abiertos con las pinzas entomológicas suaves y disponerlos sobre cajas Petri (Ver Figura 3 C y D).
7. Una vez realizado el bombardeo, llevar el foliolo a las cámaras húmedas, hasta los análisis posteriores. (Ver Figura 4).

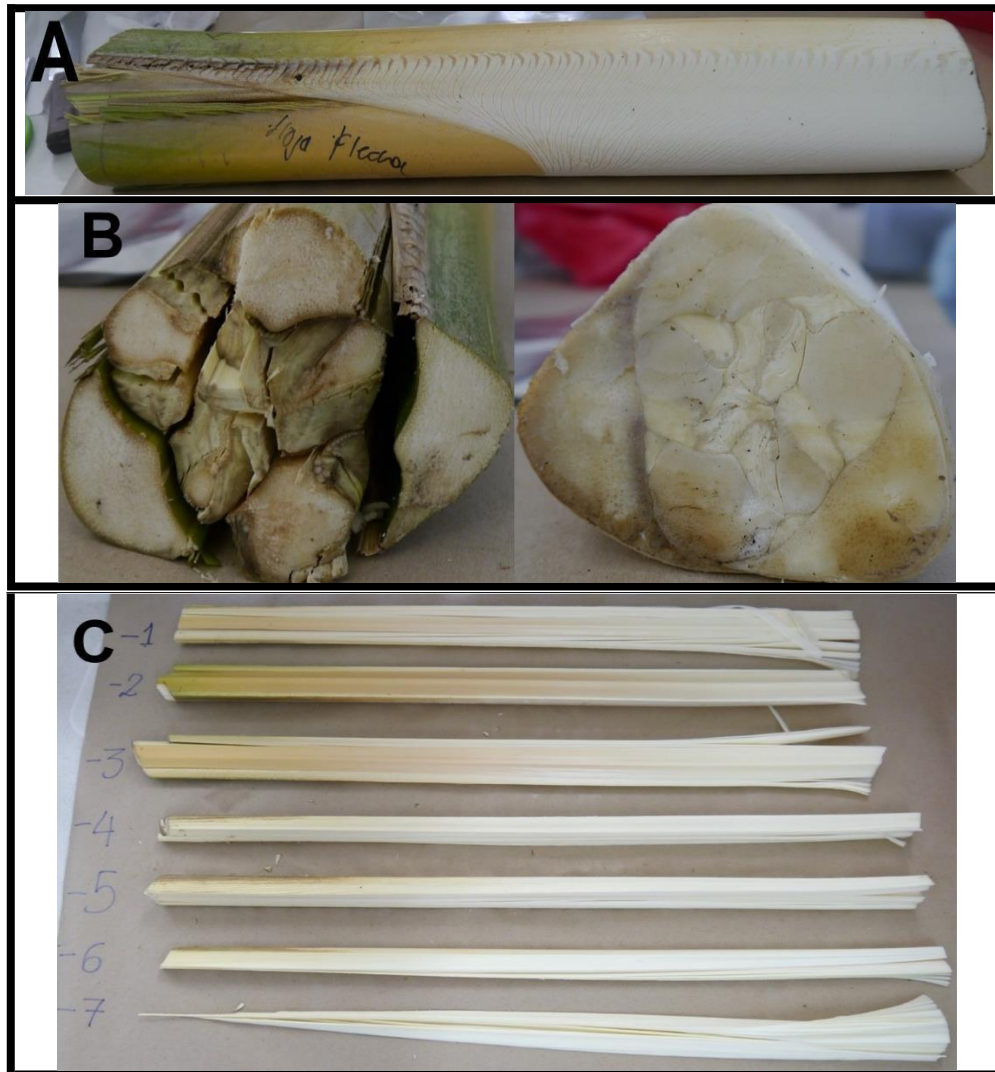
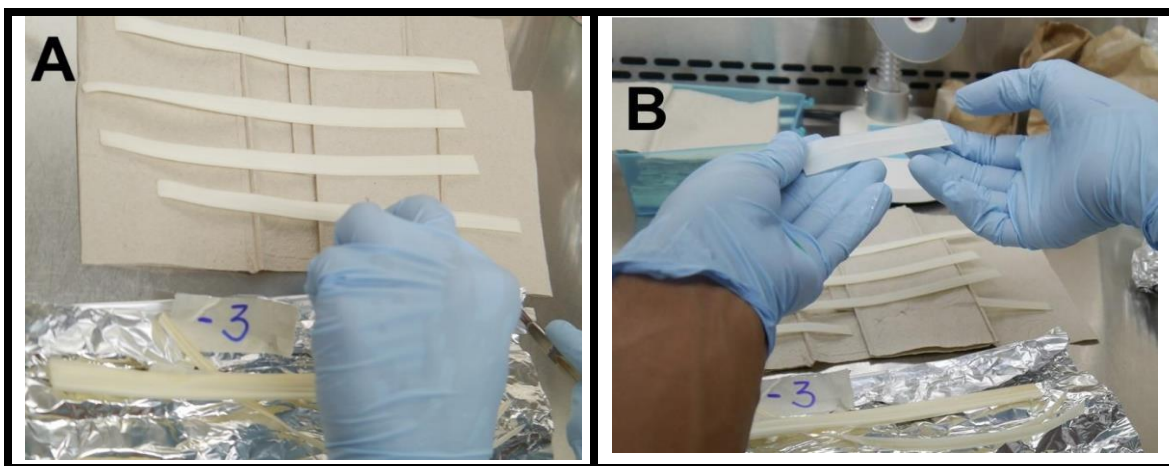


Figura 2. Vista de los cogollos usados y separación de sus hojas.



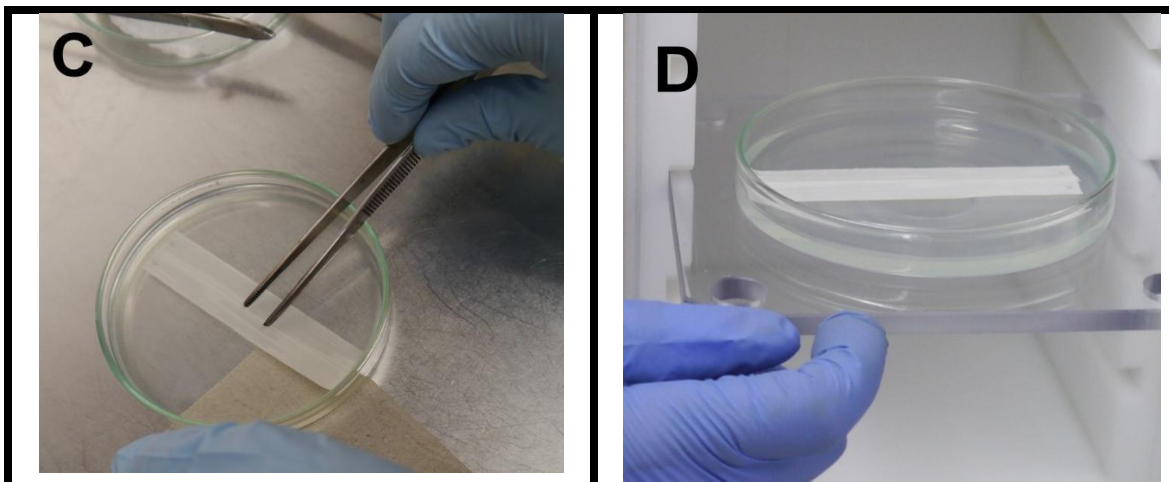


Figura 3. Preparación del foliolo para el bombardeo.

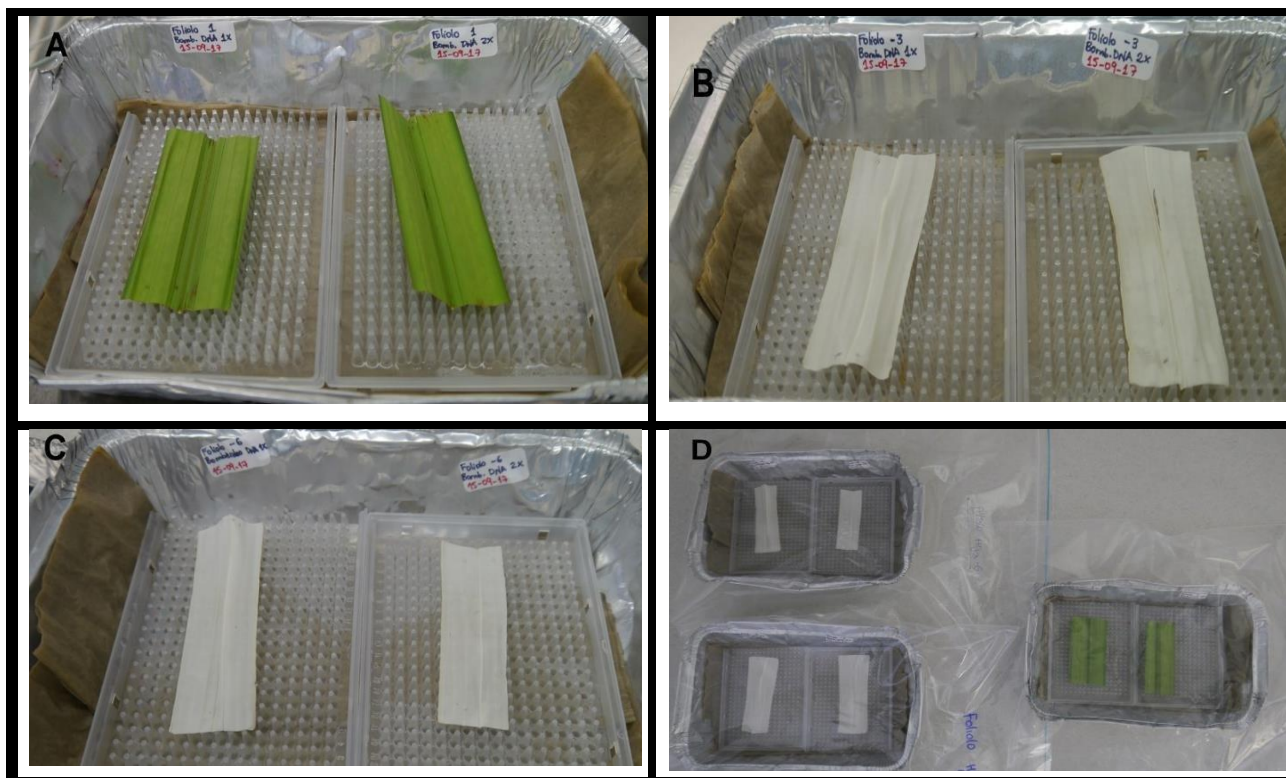


Figura 4. Foliolos en cámaras húmedas estériles después del bombardeo.

De los callos utilizados se tiene la siguiente descripción:

- **Ortet 98:** Palma del Campo experimental Palmar de la Vizcaína (Santander). Este material se iba a descartar por cumplir su tiempo en el laboratorio, el

cual es un año de subcultivos (uno cada dos meses). El callo disponible no era abundante (Figura 5).

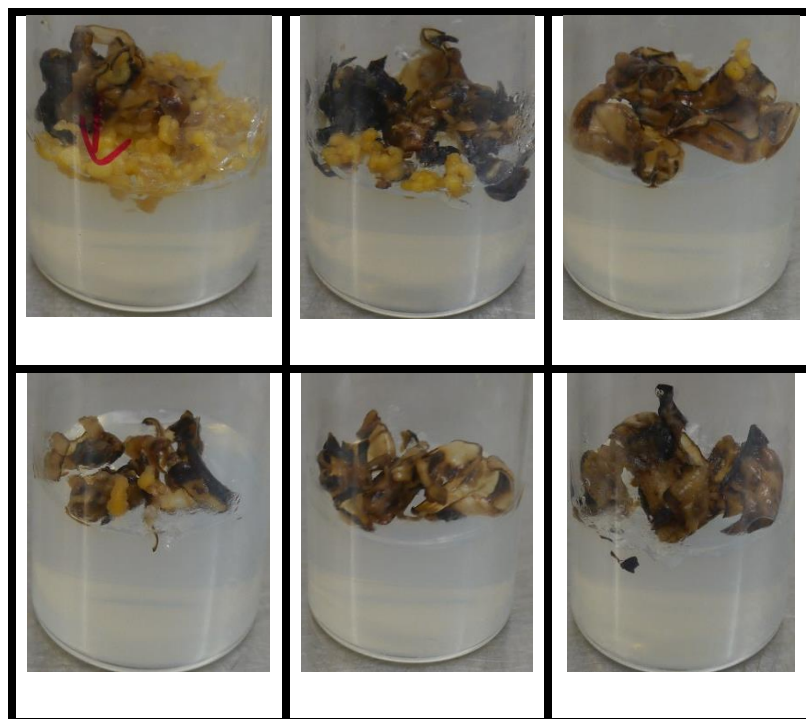


Figura 5. Callo ortet 98.

- **Ortet 106:** Palma de Puerto Wilches (Santander). La producción de callo en este material ha sido buena (Figura 6).

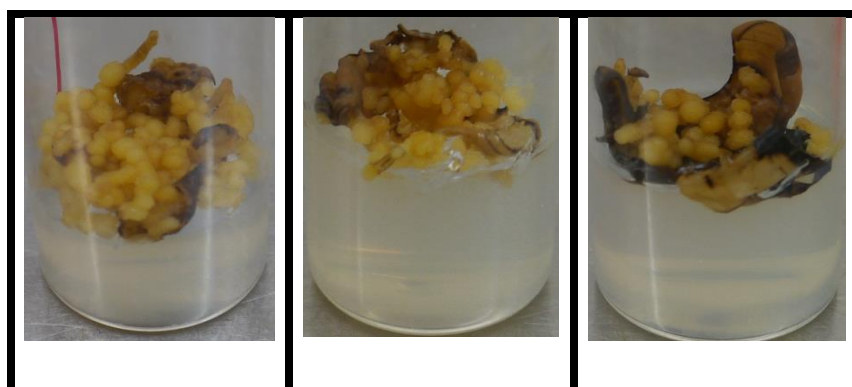


Figura 6. Callo ortet 106.

Para ser bombardeados, los callos se subcultivaron el día anterior en cajas de Petri medianas con medio M.S. (ver Figura 7).

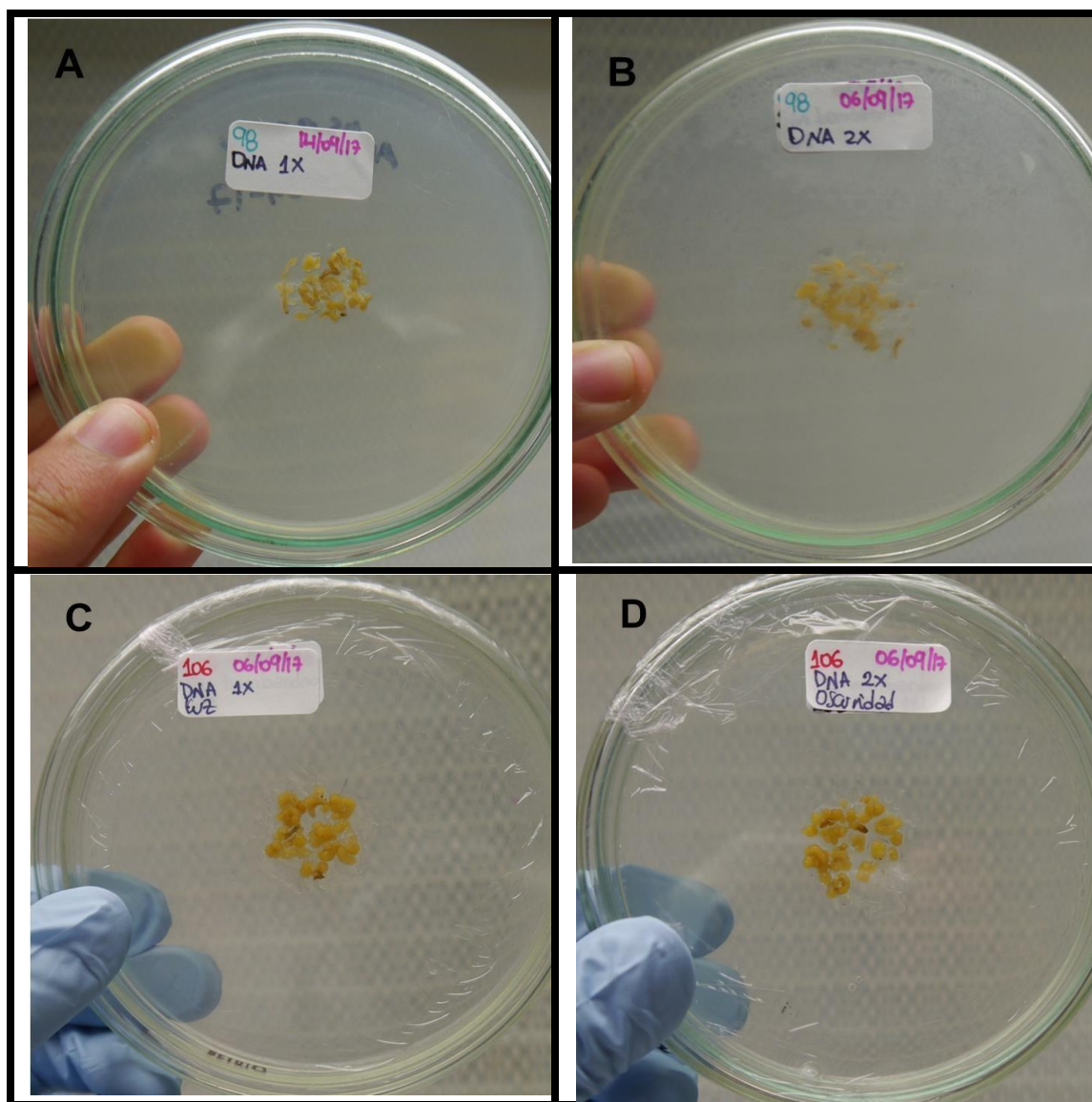


Figura 7. Arreglo final del callo en cajas de Petri previo al bombardeo.

Constructos plasmídicos.

Se usó el vector pANIC5B (Mann et al., 2012) descrito anteriormente. A este plásmido le fue insertado un gen de fluorescencia verde (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*), con el fin de tener un marcador adicional para hacer el

seguimiento de la transformación.

También se realizaron recombinaciones independientes con los efectores 2, 5 y 19 (E2, E5 y E19). Estas tres diferentes proteínas de virulencia o efectores pertenecen a *Phytophthora palmivora*. Previamente, el Dr. Sebastian Schornack (the Sainsbury Laboratory), identificó que estas proteínas se expresan diferencialmente en la interacción *P. palmivora*- *Nicotiana benthamiana*, estos efectores fueron recibidos y clonados en vectores de expresión. Los constructos pANIC5B::GFP, pANIC5B::E2, pANIC5B::E5 y pANIC5B::E19 fueron verificados mediante secuenciación. Estos vectores se replicaron en crecimientos líquidos. Este ADN plasmídico fue cuantificado por espectrofotometría (Tabla 3) y usado para los bombardeos. Para el ensayo de transformación transitoria número 8, se usó ADN plasmídico con los genes AvrPto (Gen de virulencia/Efector) y Pto (Proteína de reconocimiento).

Tabla 3. ADN plasmídico usado en cada ensayo de transformación por biobalística.

Ensayo de transformación	Plásmido
1	pANIC5B::GFP
2	pANIC5B::GFP
3	pANIC5B::GFP
4	pANIC5B::GFP
5	pANIC5B::E5
6	pANIC5B::E5
7	pANIC5B::E2
8	AvrPto 1
	AvrPto 2
	Pto 1
	Pto 2
9	pANIC5B::E2
10	pANIC5B::GFP
11	pANIC5B::E2
12	pANIC5B::E19
13	pANIC5B::E19

Preparación ADN-Microcarriers.

Se usaron micropartículas de oro, con el plásmido (Tabla 3) y sin este.

Ensayos de transformación mediante bombardeo por biobalística.

Para los ensayos de transformación se usó un sistema de pistola de biobalística (Figura 8). Se determinó el efecto de la concentración del ADN (masa) del plásmido a insertar como variable biológica. Siguiendo las pautas de transformaciones realizadas por biobalística en palma de aceite (Parveez et al., 1997; Parveez & Bahariah, 2012).



Figura 8. Pistola de biobalística empleada en los ensayos.

En los ensayos de transformación se tuvieron en cuenta como parámetros físicos a concertar: la presión de helio, la presión de vacío, y, la distancia entre la malla de detención y el objetivo. Los parámetros referentes a las distancias entre i) el disco de ruptura y el macrocarrier, ii) el macrocarrier y la malla de detención, se usaron según lo optimizado en otros trabajos previos (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros físicos y biológicos para el bombardeo por biobalística definidos para folíolos de palma de aceite.

Masa ADN*	Presiones		Distancias			Referencia
	He	Vacío	Disco ruptura-macrocarrier	Macrocarrier-Malla de detención	Malla de detención-Muestra	
0,62 µg	1100 psi	NR	6,35 mm	11 mm	75** mm	Chowdhury et al. 1997.
1,43 µg	1100 - 1350 psi	27 inHg	6,35 mm	11 mm	60 - 90 mm	Zubaidah & Siti Nor Akmar, 2003.
0,42 µg	1100 psi	27 inHg	6,35 mm	11 mm	60 mm	Omidvar et al. 2008.

Abreviaciones: **He**, Helio. **NR**, No reporta. *Masa de ADN por bombardeo. **75 mm corresponde a la distancia de 60 mm, sólo que se le han agregado los 15 mm del espesor de la placa.

La descripción de cómo se realizó cada bombardeo se describe brevemente a continuación.

Antes del bombardeo.

1. Abrir la cámara de bombardeo y limpiar el interior con etanol 70%.
2. Con la puerta abierta, girar la válvula arriba del cilindro de helio. Encender el regulador, hasta alcanzar una presión 200 psi por encima de la operacional.
3. Presionar el botón de encendido del dispositivo.
4. Tomar el disco de ruptura a usar, remojarlo en isopropanol. Ubicar el disco en el fondo de la tapa retenedora. Poner la tapa retenedora de vuelta a su lugar en la cámara de bombardeo (Ver Figura 9 B-G).

5. Sacar la placa soporte del macrocarrier, y en el fondo de esta situar la malla de detención con pinzas de punta fina. Acomodar el ensamblaje macrocarrier + holder cargado al revés sobre la malla de detención, de modo tal que la solución de bombardeo quede hacia abajo. Apretar la tapa aseguradora de macrocarrier sobre el holder. Poner la placa soporte del macrocarrier de vuelta en la primera marca dentro de la cámara de bombardeo con el agujero para la llave inglesa apuntando hacia el frente (Ver Figura 9 H-L).

6. Ajustar la distancia entre el disco de ruptura y el macrocarrier.

Durante el bombardeo.

1. Colocar la caja Petri con los folíolos a bombardear sobre la placa para muestras y ubicarla dentro de la cámara de bombardeo en la segunda o tercera marca,
2. Cerrar la compuerta de la cámara de bombardeo y encender la bomba de vacío.
3. Girar la válvula de control de vacío. Realizar el vacío, dejar que la aguja señale la presión de vacío que se desea usar, y mantener el vacío.
4. Alcanzado el vacío mínimo, ocurre el bombardeo de las micropartículas cargadas de ADN plasmídico sobre los folíolos.

Después del bombardeo.

1. Cambiar el interruptor una posición media. Cerrar la válvula de control de vacío y liberar el vacío.
2. Cuando la presión de vacío llegue a cero, cerrar la válvula y abrir la compuerta para extraer el tejido bombardeado.
3. Apagar la bomba de vacío.
4. Desmontar el macrocarrier, la malla de detención y el disco de ruptura.
5. Limpiar la cámara de bombardeo y cada parte con alcohol 70%.
6. Montar los materiales para el siguiente bombardeo.

7. Al terminar todos los bombardeos, cerrar la válvula del cilindro de helio.

8. Apagar el equipo y limpiar los posibles restos de discos o macrocarriers.

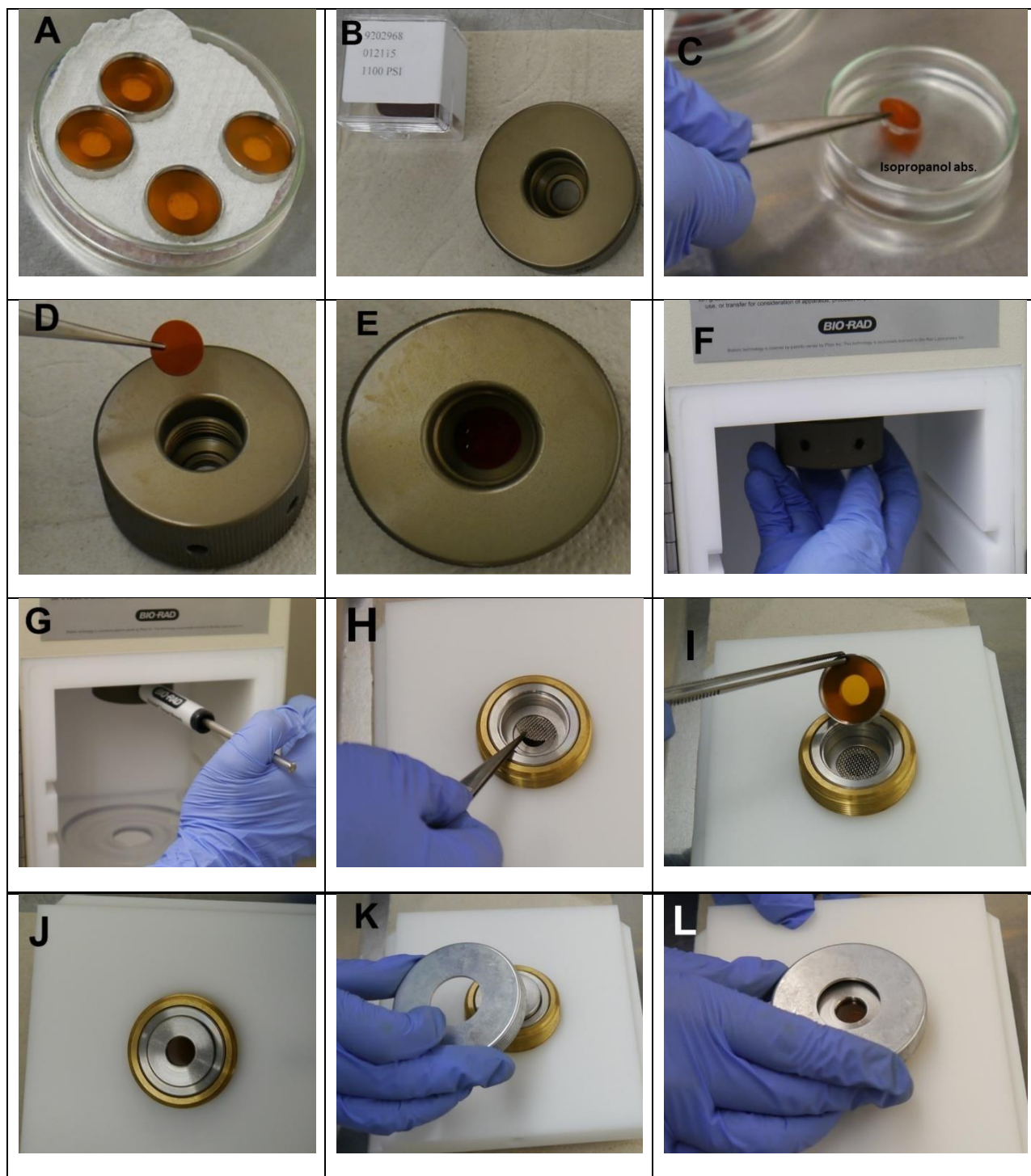


Figura 9. Secuencia de montaje set de biobalística.

Ensayos con genes marcadores.

Detección de β -glucuronidasa mediante tinción con buffer GUS (X-Gluc).

Para verificar la eficiencia de la transformación transitoria se usó la expresión del sistema reportero del gen *GUSPlus*. Horas después del bombardeo se realizó el ensayo GUS descrito por Jefferson et al. (1987) con las modificaciones sugeridas por Omidvar et al. (2008). Los puntos azules se observaron y contaron manualmente usando luz blanca en el estereoscopio. Cada punto azul formado de la localización histoquímica de la actividad de GUS fue considerado como una sola transformación sin importar su tamaño. Estos datos se sometieron a pruebas de aleatoriedad (Prueba de rachas), prueba de normalidad Shapiro-Wilk, ambas con $p \leq 0,05$; y a partir de estas, se determinó si las varianzas podían ser comparadas en una ANOVA unidireccional $p \leq 0,05$, usando el programa IBM SPSS Statistics 25.0.

Ensayo de microscopía fluorescente con GFP.

Transcurridos días después de la transformación, se observaron los tejidos de los ensayos de transformación transitoria número 1 y 2 en el microscopio de fluorescencia para ver la expresión del gen de la proteína verde de fluorescencia (GFP). Los tejidos se observaron bajo diferentes filtros.

Ensayos histoquímicos indicadores de posible muerte celular (HR).

Para el reconocimiento de una posible muerte celular seguida de la respuesta hipersensible (HR) en los folíolos bombardeados con los efectores, se detectaron *in situ* especies reactivas de oxígeno (ERO), como lo son el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido.

Prueba DAB (3,3'-diaminobenzidina).

La prueba DAB se usó para detectar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los tejidos vegetales. Este ensayo se realizó basado en lo descrito por Pico (2015) modificado de Thordal-Christensen et al. (1997), y, Daudi et al. (2012). Horas después del bombardeo, se llevó a cabo la tinción y los folíolos fueron observados en el estereoscopio. Se calculó el porcentaje de cobertura de la tinción mediante una cuadrícula. Estos datos se sometieron a pruebas de aleatoriedad (Prueba de rachas), prueba de normalidad Shapiro-Wilk, ambas con $p \leq 0,05$; y a partir de estas, se determinó si las varianzas podían ser comparadas en una ANOVA unidireccional $p \leq 0,05$, usando el programa IBM SPSS Statistics 25.0.

Prueba NBT (Nitro Blue Tetrazolio).

La prueba NBT se realizó para detectar el anión superóxido (O_2^-). Estos ensayos se realizaron basado en lo descrito por Pico (2015) modificado de Hükelhoven & Kogel (1998). Pasadas horas del bombardeo, los discos de folíolos bombardeados se llevaron a la solución de tinción NBT. Los folíolos se observaron en el estereoscopio. Se calculó el porcentaje de cobertura de la tinción mediante una cuadrícula. Estos datos se sometieron a pruebas de aleatoriedad (Prueba de rachas), prueba de normalidad Shapiro-Wilk, ambas con $p \leq 0,05$; y a partir de estas, se determinó si las varianzas podían ser comparadas en una ANOVA unidireccional $p \leq 0,05$, usando el programa IBM SPSS Statistics 25.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de expresión transitoria son una técnica de rápida expansión, que permite nuevas estrategias para estudios transgénicos sin las demoras ni los riesgos ambientales asociados con la producción de plantas transgénicas estables. En muchos casos, han mostrado proveer la misma información que las aproximaciones que usan plantas transgénicas (Lu et al., 2007). La biobalística, ha sido el método más efectivo para transformación de monocotiledóneas y cultivos agrónomicamente importantes (Potrykus, 1991; Majid & Parveez, 2007). También, ha correspondido al método inicialmente escogido para la transformación en palma de aceite (Parveez, 2000), principalmente, debido a que en la transformación por *Agrobacterium* existe la limitación de que la planta no es un huésped natural de la bacteria (Mehrotra & Goyal, 2012). Es así como se tiene que las frecuencias de transformación en palma de aceite son más altas con la aproximación de biobalística que con *Agrobacterium*, con 1-1,5% y 0,7% respectivamente (Parveez, 1998; Parveez, 2000; Izawati et al., 2009).

Para la optimización de las condiciones del bombardeo, se tuvo en cuenta las presiones de los gases (He y vacío), las distancias del disparo (que los microproyectiles deben viajar), y la cantidad de ADN, dado que se ha reportado que estos factores tienen gran influencia en la técnica (Chavez et al., 2002). Cada uno de estos parámetros tiene un efecto en la velocidad de los microproyectiles y cómo interactúan con el tejido. A mayor velocidad, mayor es la probabilidad de penetrar el foliolo, lo que es particularmente importante al usar microcarriers pequeños (Klein et al., 1990). Los ensayos de transformación transitoria se realizaron con micropartículas de oro, las cuales representan algunas ventajas al exhibir características especiales como; bioquímicamente inertes, ausencia de reactividad con el ADN y otros componentes de la mezcla, textura uniforme y lisa, y, baja toxicidad para las células vegetales (Valerio & García, 2008). Cada partícula de oro llevaba adherida por cohesión el plásmido pANIC5B::Efector (E4, E5 y E19).

Eficiencia y seguimiento de transformación.

Ensayo GUS

Los folíolos y callos mostraron expresión del gen *GUSPlus*, lo cual se visualizó con la presencia de precipitados (puntos) azules. El análisis de la información se hizo teniendo en cuenta el número de estos puntos, permitiendo así determinar la tasa de transcripción del gen, resultado de la interacción de secuencias regulatorias presentes en el promotor con factores de transcripción (Ruíz-Medrano et al., 1999). Estos puntos indican hidrólisis de la sustancia cromogénica X-Gluc (adicionado en la solución tampón), por parte de la enzima β -glucuronidasa, proteína producida por el gen *GUSPlus*, que resulta en 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo (sustancia de color azul) en las células transformadas (Mariani et al., 2015). El ensayo GUS es fácil, sensible, de bajo costo, seguro, de fácil observación y señaló los lugares donde hubo expresión y por tanto inserción del ADN plasmídico, mostrando el éxito del bombardeo (Jefferson et al., 1987).

El patrón de expresión de *GUSPlus* varió de localizado a disperso. Estas diferencias pueden deberse al punto del impacto de los microproyectiles y las diferencias en la integración del ADN (Zainal & Abdullah, 1996). Se relacionó el número de precipitados obtenido bajo cada ensayo de transformación transitoria y el material vegetal usado (Eg: *Elaeis guineensis*; OxG: Híbrido interespecífico). La información se encuentra reflejada en la Figura 10, permitiendo ver que los ensayos más exitosos en términos de número de transformaciones localizadas fueron los números 9 y 10 para folíolos del híbrido OxG, y el número 2 para folíolos de *E. guineensis*.

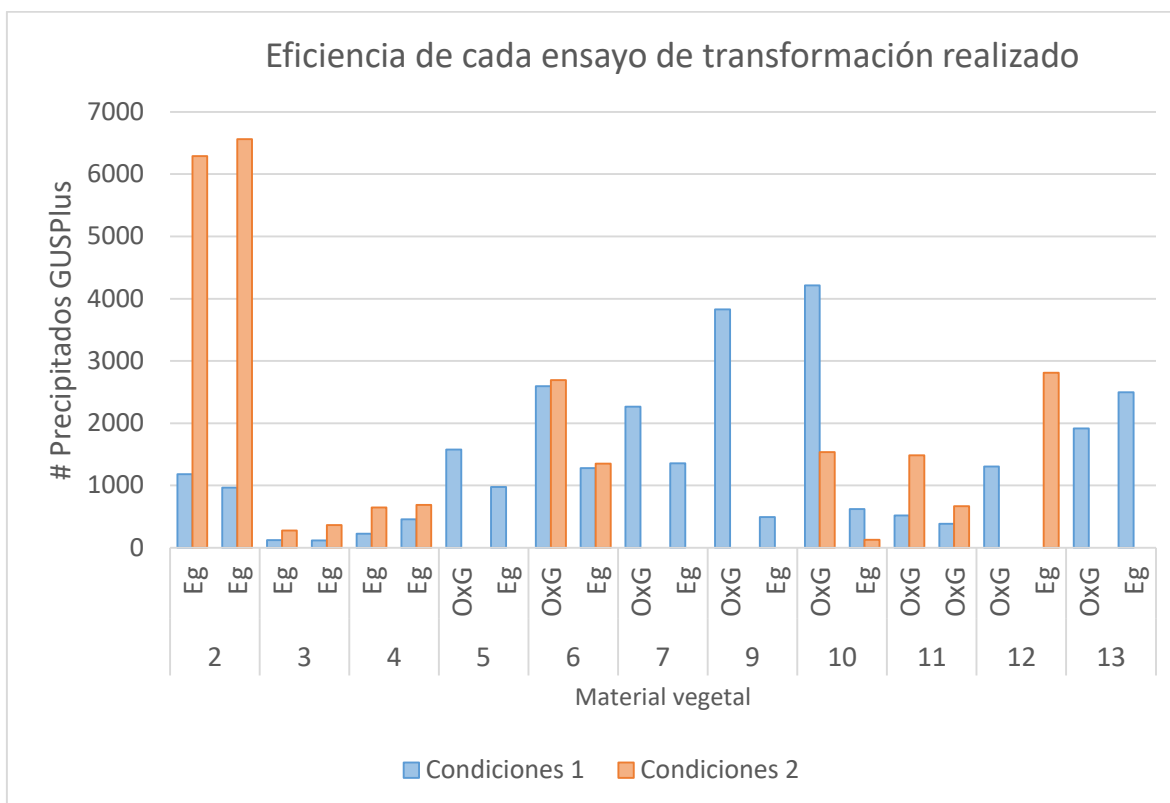


Figura 10. Eficiencia de cada ensayo de transformación transitoria realizado.

En total se realizaron ocho diferentes combinaciones de variables físicas y biológicas durante los ensayos de transformación, donde se probaron diferentes parámetros para: la presión de helio, la presión de vacío, la distancia entre la malla de detención a objetivo, y la masa de ADN. Teniendo en cuenta la cantidad de puntos azules, se obtiene la Figura 11. Esta indica que los folíolos de *E. guineensis* alcanzaron mayores tasas de transformación usando para cada bombardeo la condición #2. Los datos de este cultivar mostraron una distribución aleatoria, según la prueba de Rachas (IBM SPSS Statistics 25.0), con un valor de 0,703; y, distribución normal, según la prueba de normalidad Shapiro-Wilk con valores por encima de 0,05 y 5 grados de libertad. La ANOVA unidireccional mostró que hay diferencias significativas entre las distintas combinaciones para alcanzar la mayor eficiencia ($p=0,03$; $F=3,315$); por lo tanto, la condición #2 es más eficiente que las demás. Se observa también, que en todos los casos las eficiencias de

transformación son mayores en los folíolos del híbrido OxG indicando que este tejido es más fácilmente penetrable durante el bombardeo.

En cuanto al cultivar OxG, los datos reflejaron una mayor eficiencia de transformación usando las condiciones #6 (Figura 11). No obstante, la ANOVA unidireccional mostró que no hay diferencias significativas entre los distintos conjuntos de condiciones con una sig. 0,200 ($F=1,740$). Esta comparación de varianzas se logró realizar ya que los datos mostraron aleatoriedad ($p=0,089$) y normalidad (3 grados de libertad).

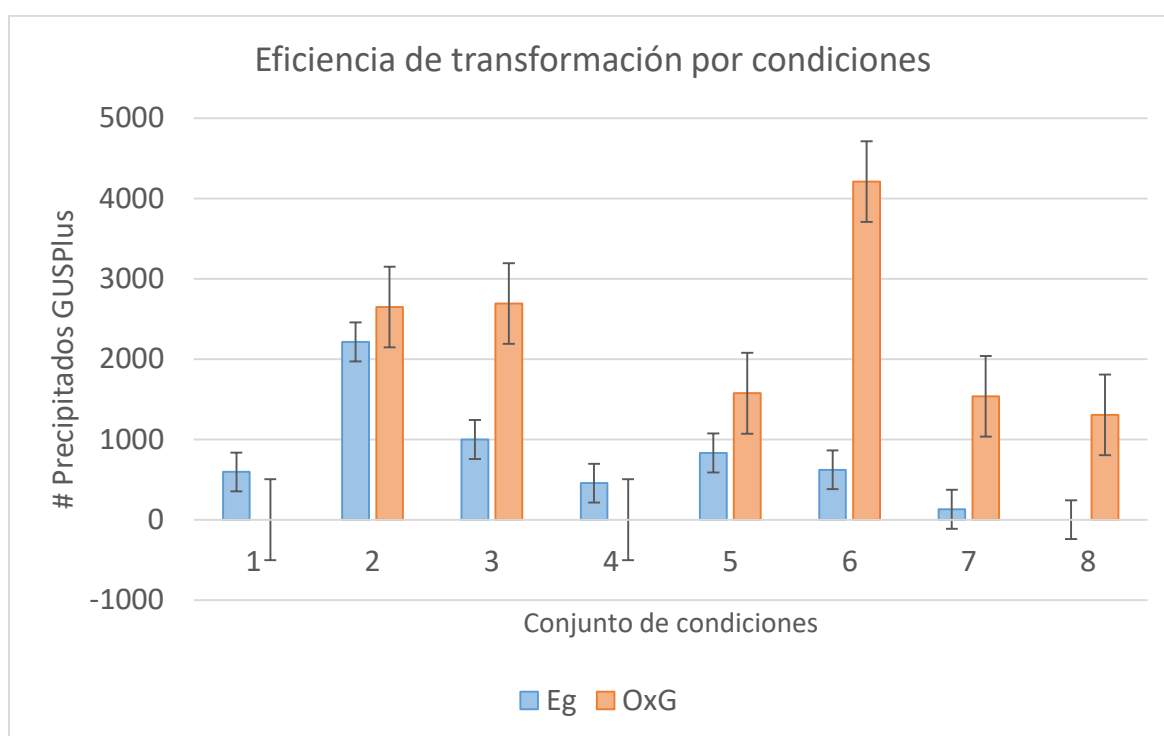


Figura 11. Eficiencia de transformación según el conjunto de condiciones de bombardeo utilizadas.

Finalmente, la Figura 12 muestra la eficiencia de transformación de acuerdo al ADN plasmídico usado. A partir de ella es posible decir que el híbrido OxG alcanza la mayor eficiencia usando pANIC5B::GFP y *E. guineensis* con pANIC5B::E19. Pero, las pruebas de ANOVA unidireccional para cada uno de los cultivares mostraron

que no hay diferencias significativas en la eficiencia entre cada constructo plasmídico.

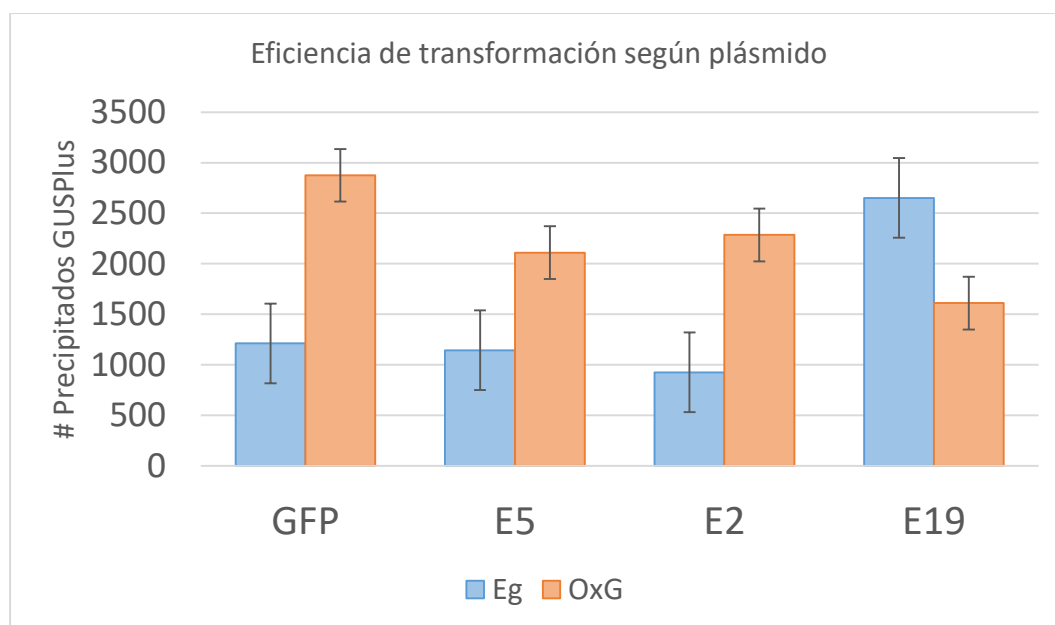


Figura 12. Eficiencia de transformación según el plásmido usado.

El número de precipitados azules en los folíolos, resultantes de los ensayos de expresión transitoria del gen *GUSPlus* con el promotor *Ubi1* de *Panicum virgatum* L. - (Figura 1), en el presente trabajo; muestran valores ligeramente menores en comparación con otros experimentos reportados también en folíolos de palma de aceite, con el gen *gusA* (Masura et al., 2010; Masura et al., 2011). Sin embargo, los constructos usados por Masura y colegas, difirieron no solamente en el gen *GUS* usado, sino también, en los promotores constitutivos del cassette, siendo así más eficiente la expresión con el *Ubi1* de *Zea mays* L. A su vez, este mismo promotor fue usado en los presentes ensayos transitorios para la expresión de los efectores (Figura 1). Por otro lado, Chowdhury y colegas (1997), obtuvieron un menor promedio de puntos azules durante la expresión transitoria del gen *GUS* (*UidA*) usando diferentes promotores derivados de maíz, en folíolos de palmas jóvenes. Por lo anterior, es posible decir que los constructos utilizados en la transformación constituyen un factor importante para determinar el éxito y eficiencia de la misma (Chowdhury et al., 1997).

En cuanto a la transformación del callo, esta no resultó ser muy eficiente con las condiciones utilizadas, y es por esto que en la Figura 13 se observa que tan sólo se obtuvo un precipitado del gen *GUSPlus* en cada ensayo de transformación, por lo que se sugiere aumentar la presión de He o la de vacío con la que se realizan los bombardeos, para de esta manera alcanzar una mayor velocidad y por ende una mayor fuerza al momento de penetrar el tejido de la palma de aceite.

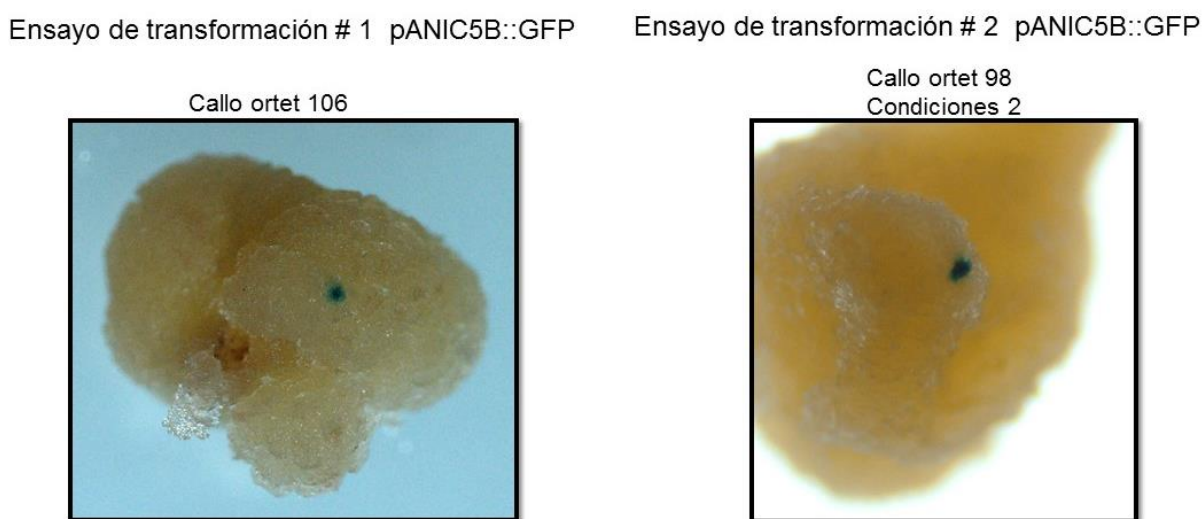


Figura 13. Expresión *GUSPlus* ensayos de transformación # 1 y 2 en callo bombardeado con pANIC5B::GFP.

Usualmente, en palma de aceite se busca transformación estable y para esto se escoge el callo como tejido de bombardeo. La transformación del callo en palma de aceite se ha logrado tanto con presiones altas (Chowdhury et al., 1997; Parveez et al., 1997), como en bajas (Lee et al., 2006; Kanchanapoom et al., 2008); lo que muestra que la combinación de parámetros a utilizar durante el bombardeo está completamente ligada al tejido a usar y las características fisiológicas del mismo. Así, en callo se obtiene algo similar a lo encontrado aquí en folíolos, a mayores presiones o menores presiones de la ideal, la expresión del GUS disminuye notoriamente (Chowdhury et al., 1997; Parveez et al., 1997; Lee et al., 2006;

Kanchanapoom et al., 2008). Esto también se ha encontrado en arroz (Zuraida et al., 2010) y yuca (Schopke et al., 1997).

La disminución en la expresión en presiones de helio menores, puede atribuirse a la pobre capacidad de penetración de las micropartículas mientras se mueven hacia el tejido. Por el contrario, a mayores presiones, la fuerza de penetración aumenta lo que puede dañar el tejido y producir muerte celular, de esta forma, aunque se produzca la inserción del gen, la célula no puede expresarlo ya que no sobrevive (Zuraida et al., 2010). Por ejemplo, en hojas de tabaco se encontró que, a presiones altas, el impacto de las micropartículas de oro era muy fuerte en el tejido vegetal, ocasionando daño mecánico y deterioro de las hojas (Pulido, 2014). Esto es consistente con nuestros resultados, donde a mayor presión el tejido se mostraba altamente lastimado. Estos ensayos permitieron observar que la expresión de *GUSPlus* es directamente proporcional a la presión de disparo utilizada, a medida que se incrementa la presión, se obtiene un mayor número de puntos azules en los tejidos bombardeados, lo que puede estar relacionado con que hay un mayor efecto de barrido de las micropartículas de oro que se encuentran adheridas al cartucho (López-López et al., 2013). Sin embargo, esto solo es aplicable hasta cierta presión, porque como se mencionó anteriormente presiones superiores ocasionan deterioro y oxidación del tejido, lo que resulta en poca expresión de *GUS* (Helenius et al., 2000).

A distancias más cortas se mostró mayor expresión del gen *GUSPlus*. Mientras que a una distancia media se obtuvo una menor expresión. Por el contrario, a presiones altas del gas, la expresión fue mayor al aumentar la distancia y disminuyó al acercar el objetivo a la malla de detención, posiblemente dado el gran daño al tejido. Este efecto interactivo al cambiar dos variables simultáneamente, que afecta en gran medida el nivel de expresión transitoria, también ha sido observado en arroz (Zuraida et al., 2010), trigo (Gharanjik et al., 2008), y yuca (Schopke et al., 1997). Optimizar esta distancia es requisito, ya que permite una difusión homogénea del conjunto microcarriers-ADN en el tejido sin causar daño (Russell et al., 1992).

La presión de vacío en la cámara de bombardeo jugó un papel importante. Las fuerzas de rozamiento, y por tanto la resistencia que actúa sobre los microproyectiles durante el disparo depende de este vacío, ya que afecta directamente la tasa a la que estos pierden velocidad con la distancia. En otras palabras, en una mayor presión de vacío la velocidad de los microproyectiles se logra mantener (Kikkert, 1993). No obstante, la desventaja de mantener presiones de vacío altas es que causa que se pierda la humedad de los tejidos y, por tanto, la viabilidad de los mismos (McCabe & Christou, 1993). Por la razón anterior, en disparos en los que se usó una mayor presión de vacío se encontró un mayor daño en el tejido de los folíolos.

Por su parte, otro miembro de la familia arecaceae, la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L., 1753), alcanza su máxima expresión transitoria del gen *GUS* en callo bajo condiciones físicas totalmente diferentes a las optimizadas en el presente trabajo (Mousavi et al., 2014). Sin embargo, se debe tener en cuenta que se usan tejidos diferentes (callo-folíolos), y, por tanto, es posible que la penetración de las micropartículas en las células varíe. Según el tipo de especie vegetal evaluada, los tejidos en las plantas difieren en sus características de espesor y de superficie; igualmente, factores como la edad fenológica y el tamaño de la hoja también pueden influir en la presión adecuada (Kuriakose et al., 2012). Los parámetros del bombardeo son específicos a cada especie y tejido y necesitan ser estandarizados de acuerdo a la naturaleza de los explantes a usar (Gharanjik et al., 2008). Adicionalmente, el gen marcador usado (*uidA* y *GUSPlus*), aunque expresa la misma proteína difieren en sus rasgos genómicos como secuencia, promotor, entre otros. El alto promedio de puntos azules obtenidos con el vector pANIC5B (el presente trabajo), en comparación con otras investigaciones, es explicable porque éste contiene un gen *GUS* mejorado (*GUSPlus*), aislado de *Staphylococcus* sp., el cual ha sido modificado para optimizar la expresión en plantas, mientras que el gen *uidA* es aislado de *Escherichia coli* (Jefferson et al., 1987). Los beneficios de *GUSPlus* incluyen, mayor sensibilidad por lo que la coloración aparece en menor tiempo al actuar con el sustrato X-Gluc, mayor estabilidad térmica y mayor tolerancia a los fijadores (Vitha et al., 1995; Connett et al., 2006).

De manera adicional, es válido agregar que nuestros ensayos de transformación variaron entre sí, posiblemente por los distintos individuos usados. En este punto es válido anotar, que el material usado no era clonal, sino palmas de campo, con la variabilidad propia de cada individuo. La principal dificultad al usar los sistemas de expresión basados en biobalística es la variabilidad en el número de eventos de bombardeos individuales entre experimentos individuales. Esto requiere un gran número de ensayos que deben realizarse para obtener comparaciones estadísticamente significativas y robustas que permitan confirmar la eficiencia de transformación (Omidvar et al., 2008). En un futuro se recomendaría realizar un mayor número de eventos independientes de transformación transitoria, los cuales, desafortunadamente, no pudieron ser realizados en esta investigación por carencia del total de suministros y los tiempos que abarcan cada ensayo con respecto al tiempo total de la pasantía.

Por otra parte, después de la tinción histoquímica, en adición a los puntos azules positivos para *GUS*, se observaron parches de azul claro en el fondo de los folíolos (Figura 17, 19, 20 y 24). Un problema similar se ha reportado en callo y folíolos de palma de aceite (Chowdhury et al., 1997), y, en callo de trigo (Loeb & Reynolds, 1994). Esta complicación puede deberse a una difusión pobre de los productos de la reacción (Hu et al., 1990; Thomasset et al., 1996). Pero la misma se puede resolver ajustando la solución tampón usada durante el ensayo, manteniendo el pH en 7,0 y disolviendo de manera más eficiente los reactivos, agregando una mayor proporción de metanol (Nishihara et al., 1993; Kosugi et al., 1990).

Desde otra perspectiva, observar resultados de expresión génica de *GUSPlus* en los folíolos de palma de aceite, permitió constatar que la preparación de los macrocarriers y microcarriers se hizo correctamente, y no influyó en la ausencia de expresión en los ensayos realizados.

A continuación, se muestran las imágenes de los precipitados de la actividad β -glucuronidasa en los folíolos bombardeados, del ensayo de transformación #2 al #13.

Ensayo de transformación # 2 pANIC5B::GFP

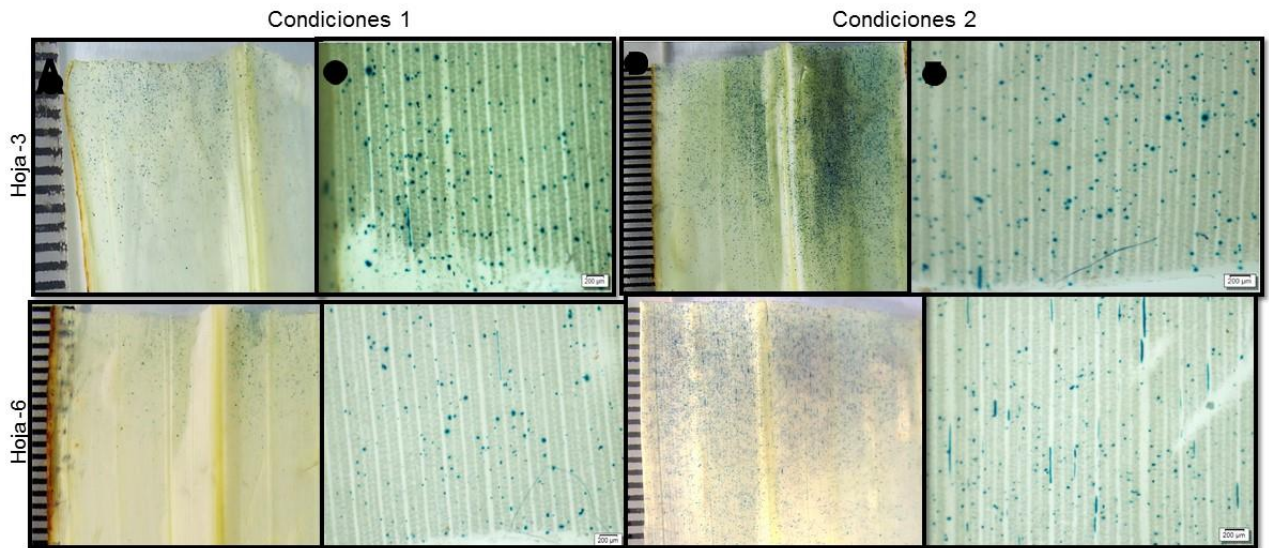


Figura 14. Expresión *GUSPlus* en folíolos ensayo de transformación # 2 pANIC5B::GFP.

Ensayo de transformación # 3 pANIC5B::GFP

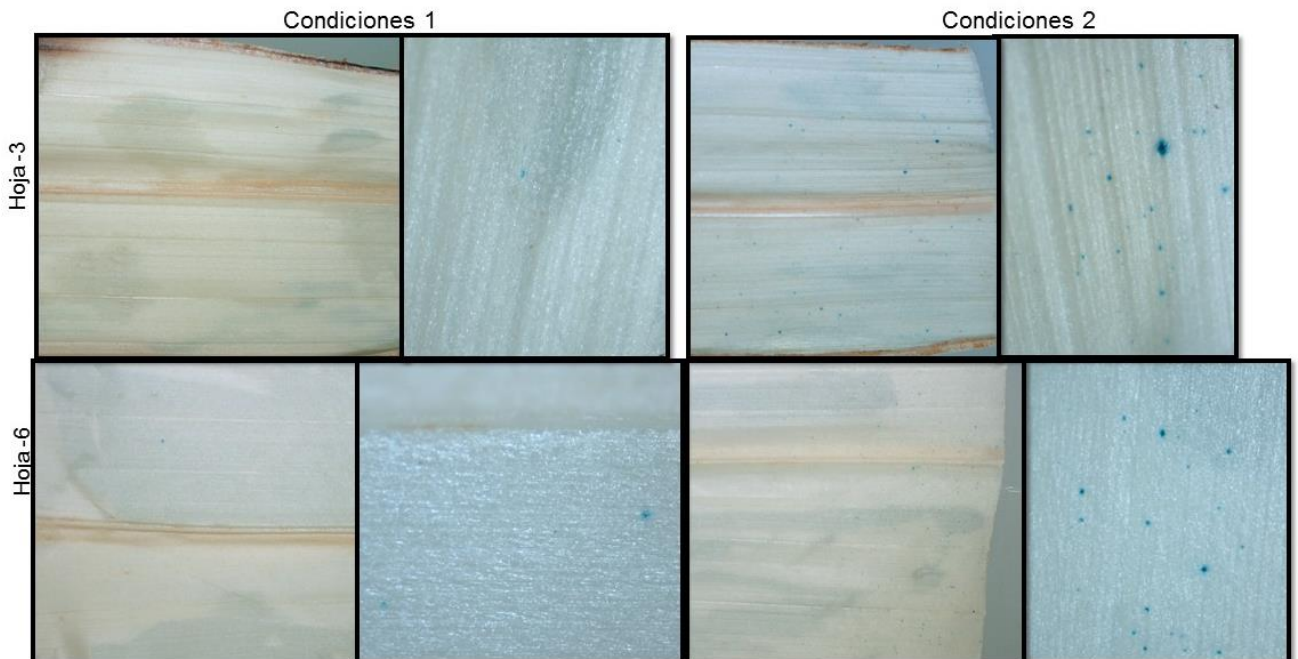


Figura 15. Expresión *GUSPlus* en folíolos ensayo de transformación # 3 pANIC5B::GFP.

Ensayo de transformación # 4 pANIC5B::GFP

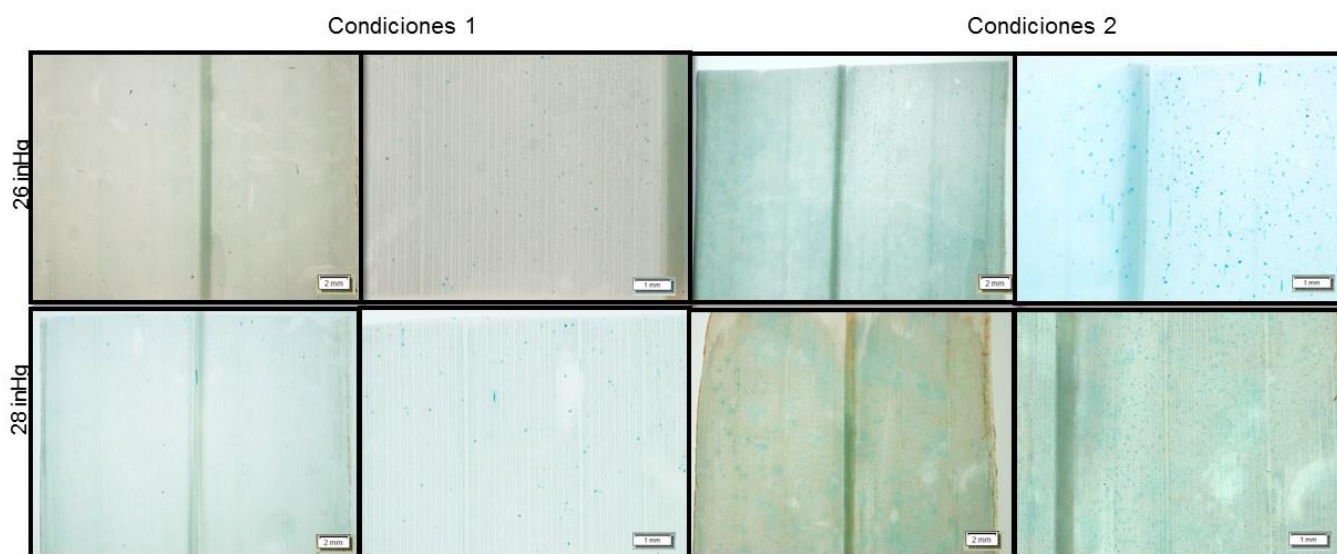


Figura 16. Expresión *GUSPlus* foliolos ensayo de transformación # 4 pANIC5B::GFP.

Ensayo de transformación # 5 pANIC5B::E5

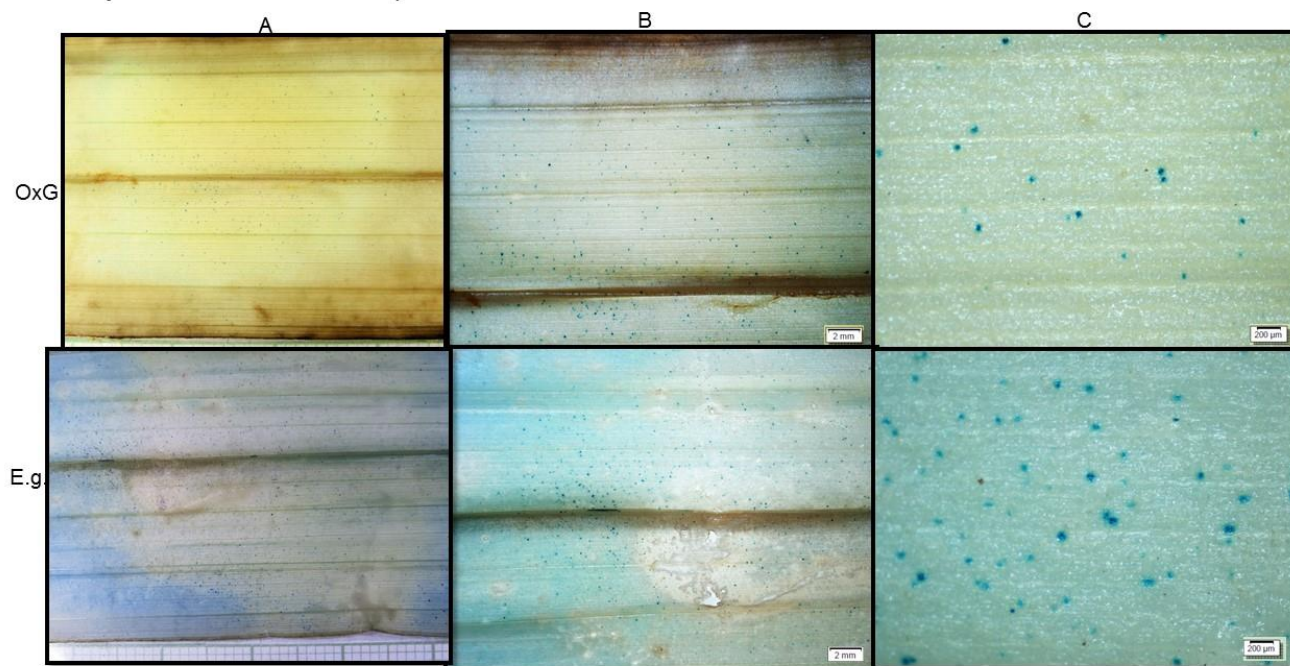


Figura 17. Expresión *GUSPlus* foliolos ensayo de transformación # 5 pANIC5B::E5.

Ensayo de transformación # 6 pANIC5B::E5

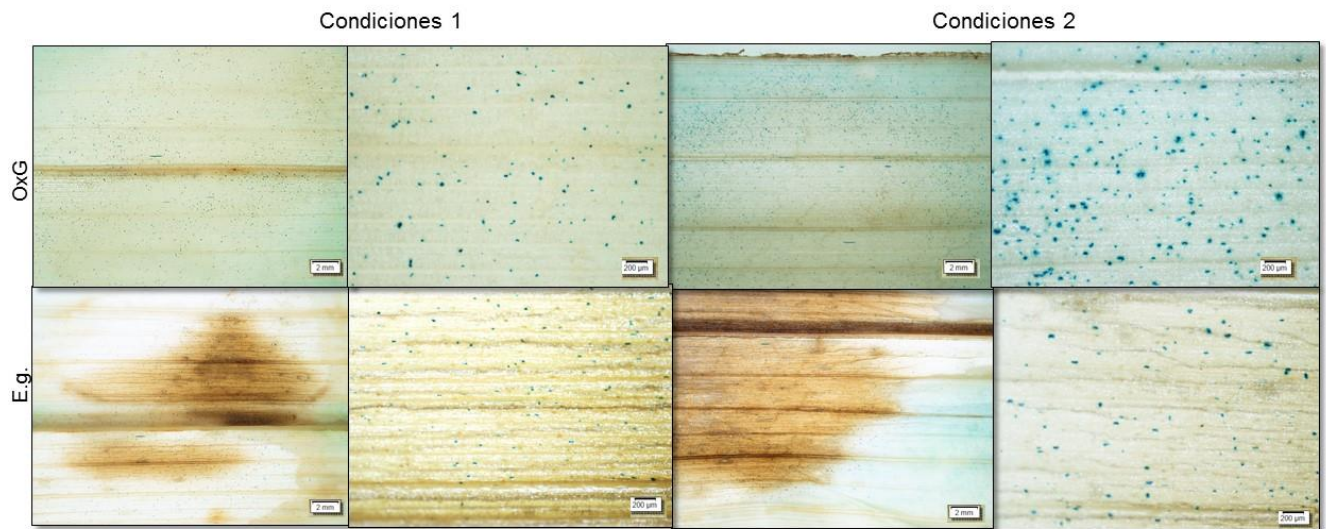


Figura 18. Expresión *GUSPlus* foliolos ensayo de transformación # 6 pANIC5B::E5.

Ensayo de transformación # 7 pANIC5B::E2

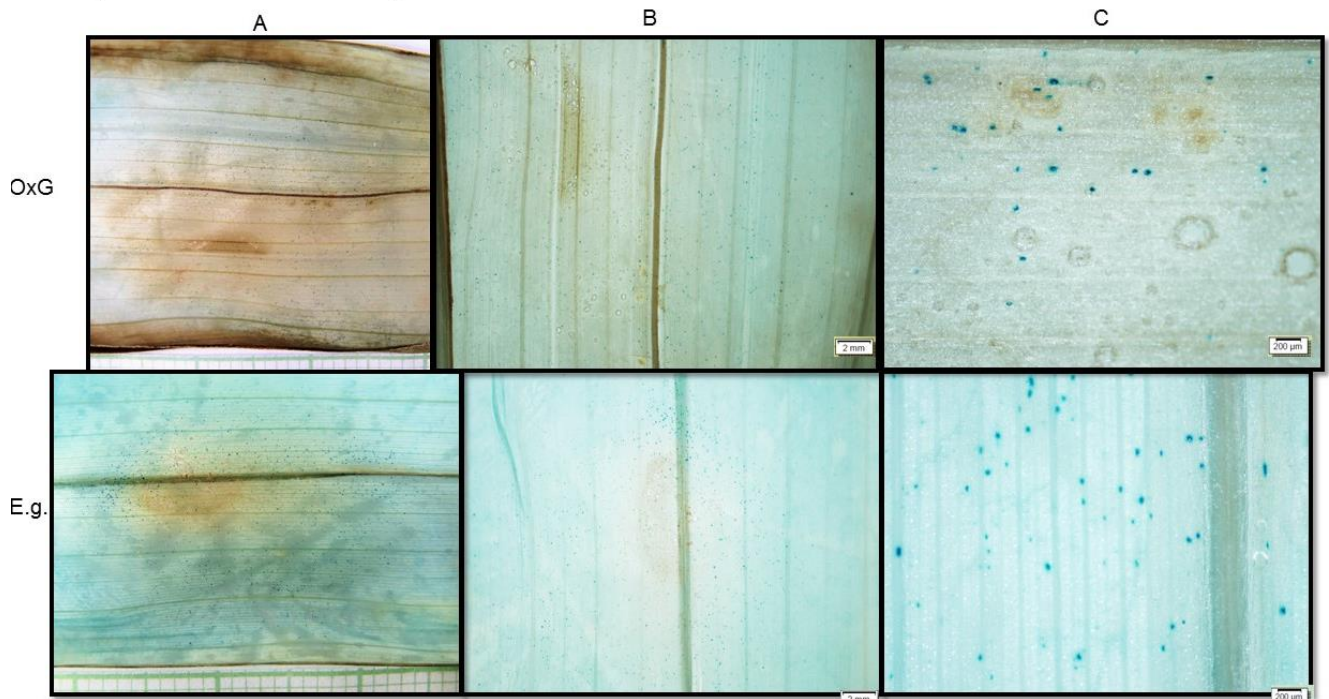


Figura 19. Expresión *GUSPlus* foliolos ensayo de transformación # 7 pANIC5B::E2.

Ensayo de transformación # 9 pANIC5B::E2

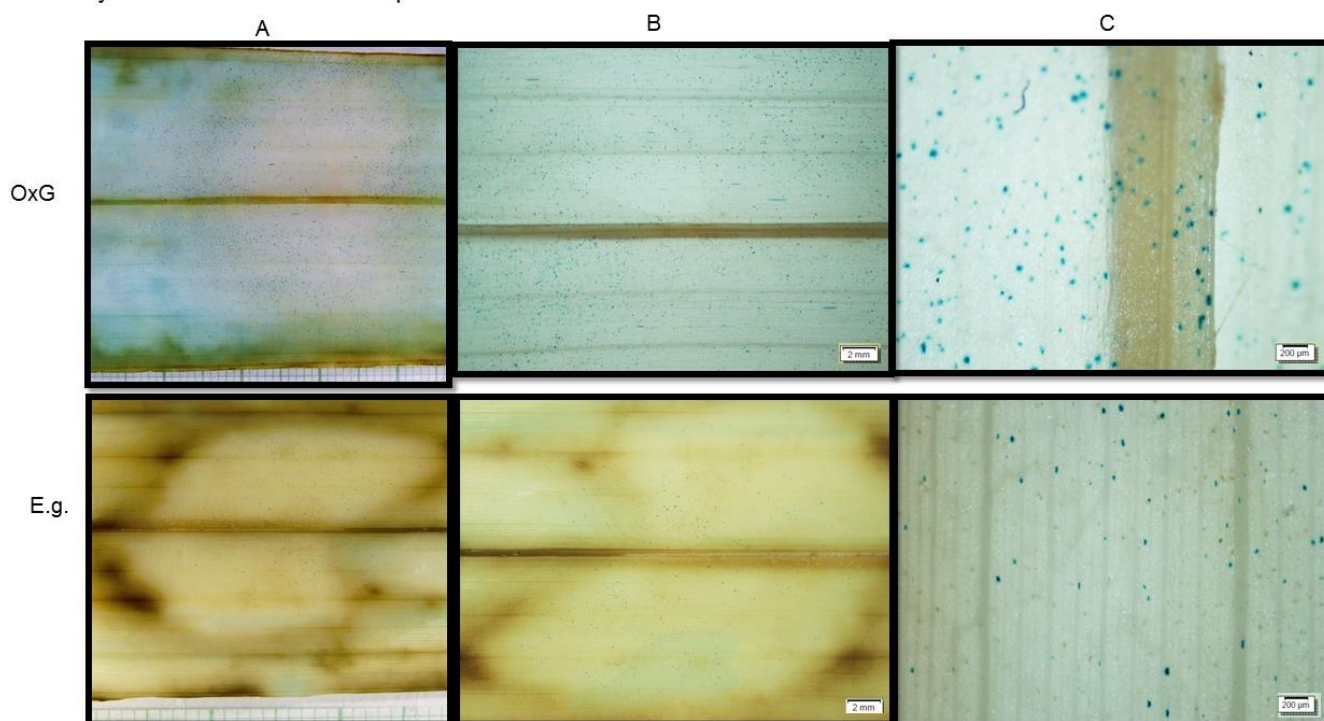


Figura 20. Expresión *GUSPlus* foliolos ensayo de transformación # 9 pANIC5B::E2.

Ensayo de transformación # 10 pANIC5B::GFP

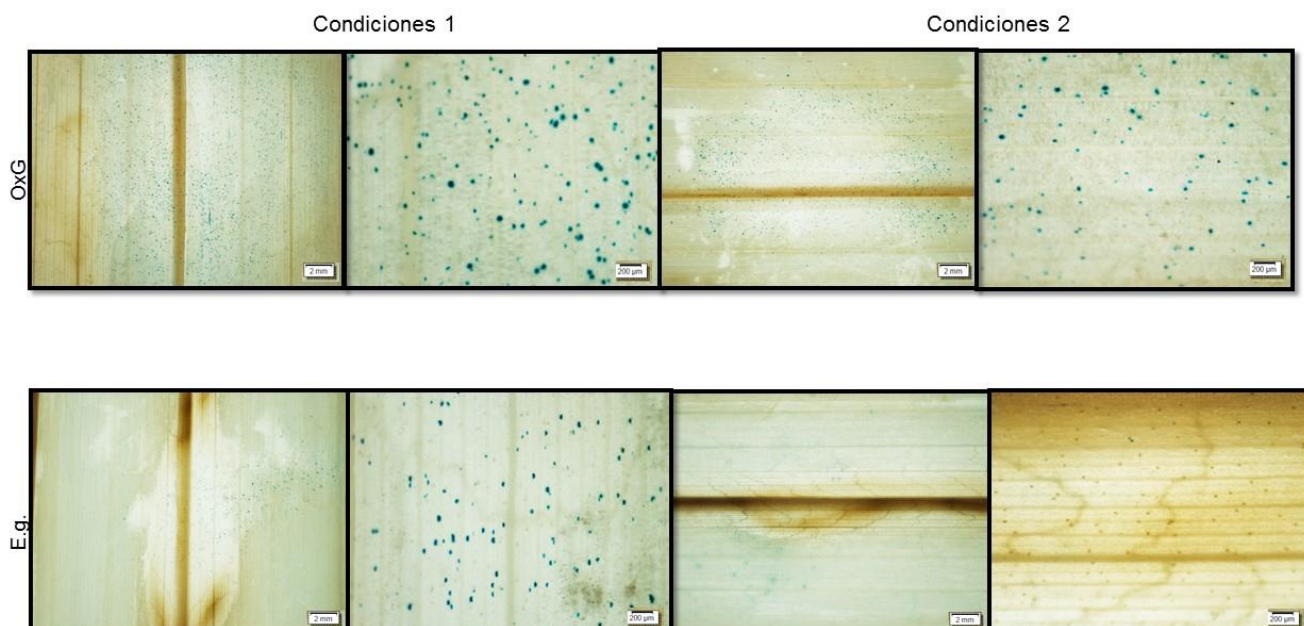


Figura 21. Expresión *GUSPlus* foliolos ensayo de transformación # 10 pANIC5B::GFP.

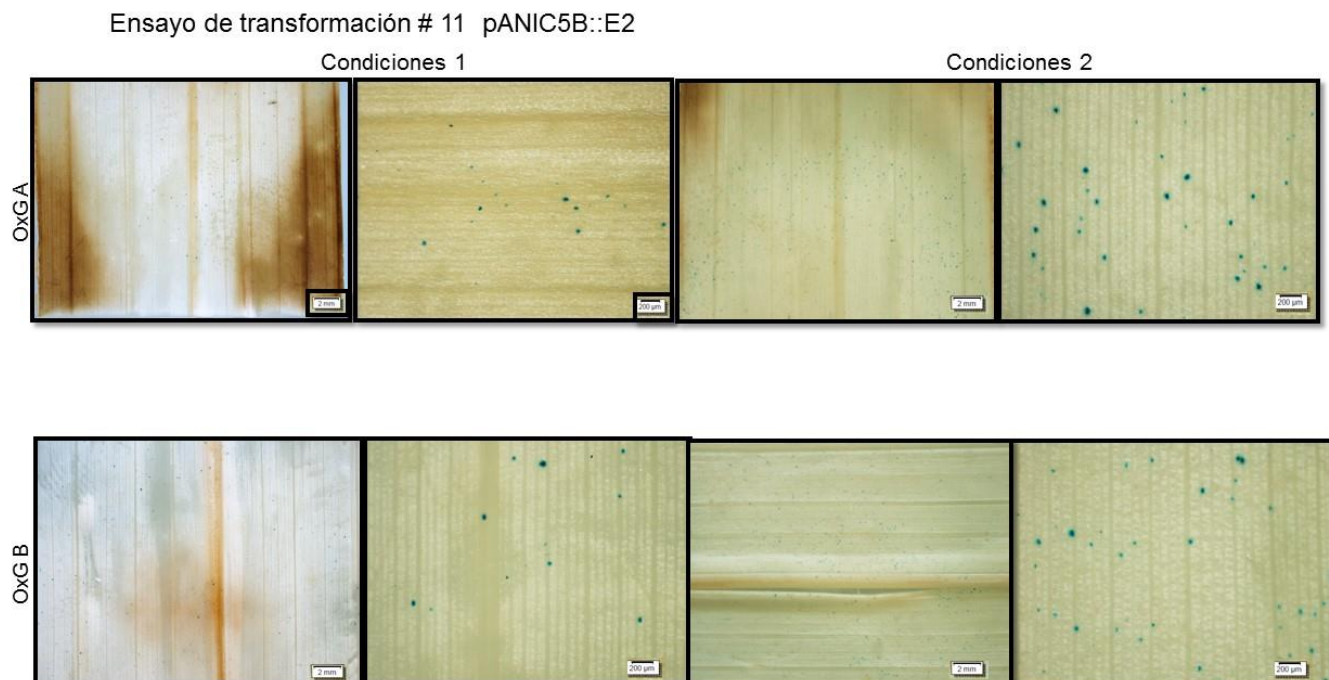


Figura 22. Expresión *GUSPlus* foliolos ensayo de transformación # 11 pANIC5B::E2.

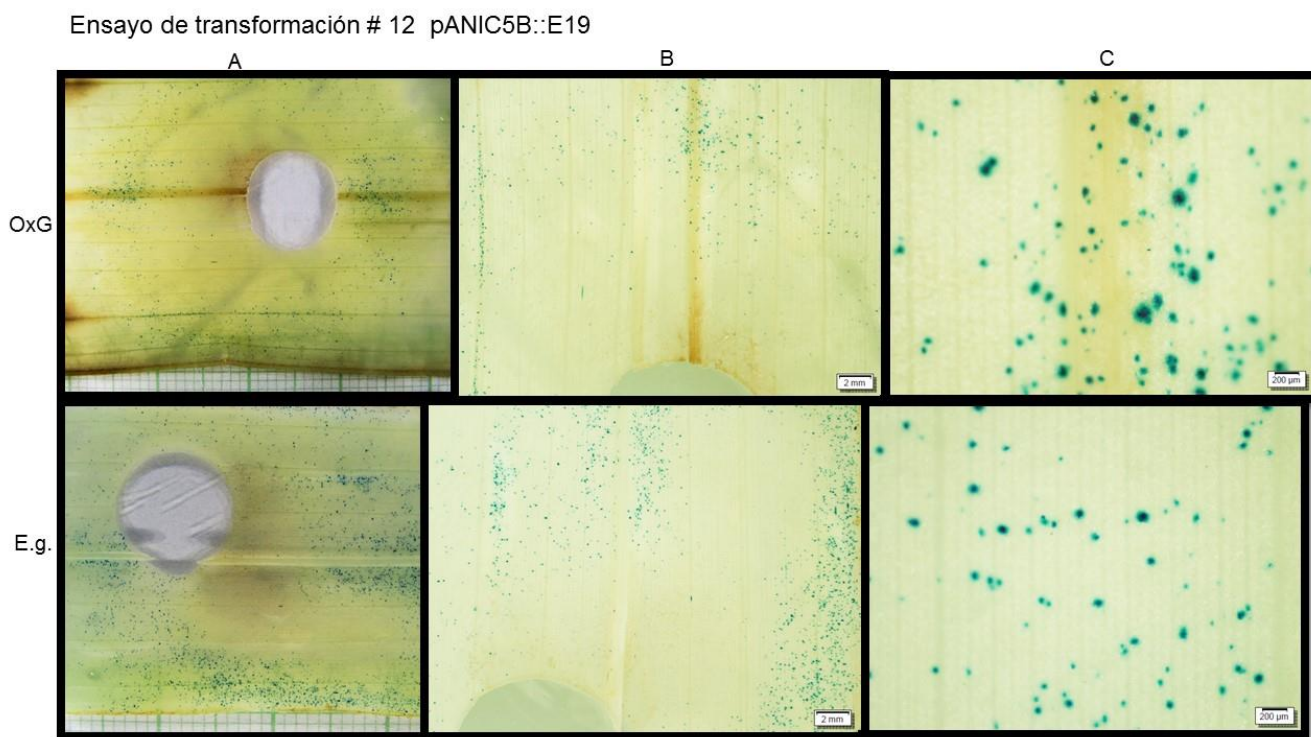


Figura 23. Expresión *GUSPlus* foliolos ensayo de transformación # 12 pANIC5B::E19.

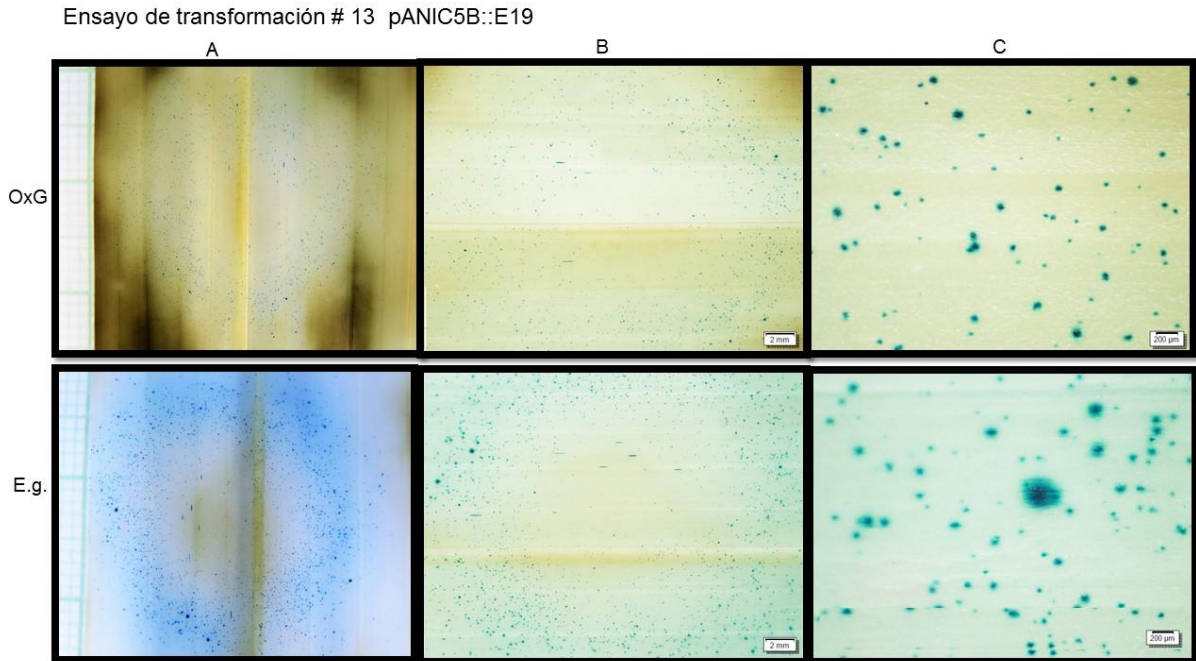


Figura 24. Expresión *GUSPlus* foliolos ensayo de transformación # 13 pANIC5B::E19.

Ensayo GFP

Uno de los sistemas reporteros de selección visual más populares es la proteína verde fluorescente (GFP), basado en el gen *gfp* aislado de la medusa *Aequorea victoria* (Chalfie et al., 1994). GFP es un reportero universal ya que no es destructivo, no requiere ningún químico o sustrato para producir la reacción, es estable en células vegetales y puede usarse para confirmar posible transformación exitosa (Heim et al., 1994; Ahlandsberg et al., 2001). La expresión transitoria de este gen ha sido estudiada previamente en callo de palma de aceite (Parveez & Majid, 2008). La fluorescencia derivada de la expresión de GFP en las células sometidas a UV/Azul se observó como puntos o manchas verde brillantes en comparación con el fondo verde pálido, el tamaño e intensidad de los puntos de fluorescencia fue variado. En la Figura 27 se muestran los folíolos del ensayo de transformación transitoria #2, en la columna A se ven los puntos cercanos al bombardeo y por esta razón se ve más intensa la fluorescencia. En la columna B, se aprecian los extremos

más alejados al bombardeo y por esto la intensidad es menor o nula, y tan sólo reducida a puntos fluorescentes. En este trabajo el ensayo de fluorescencia del gen *gfp* mostró no ser adecuado para el seguimiento de la transformación en callo, ya que como se aprecia en la Figura 25 y Figura 26, en las columnas derechas, aquellos tejidos bombardeados sin ADN e incluso los no bombardeados en lo absoluto exhibieron fluorescencia bajo el microscopio. Este fenómeno ha sido ya reportado también en callo de palma de aceite, las posibles razones para esta incluyen: que el tejido esté lastimado, muerte celular o contaminación (Majid & Parveez, 2016). También, es posible que se deba a grandes acumulaciones de cuerpos fenólicos en las vacuolas celulares o deposiciones de cutina en las paredes celulares (Nagy et al., 2005; Ogita, 2005; Peixe et al., 2004); lo que puede indicar estrés oxidativo o incluso, potencial de desarrollo de embriones somáticos (Laukkanen et al., 2000). Este problema parece ser común, ya que se reporta la presencia de autofluorescencia en otras plantas como arroz, maíz, stevia y soya (Bespalhok & Hattori, 1997; Vain et al., 2000; Ponappa et al., 2000).

Ensayo de transformación # 1

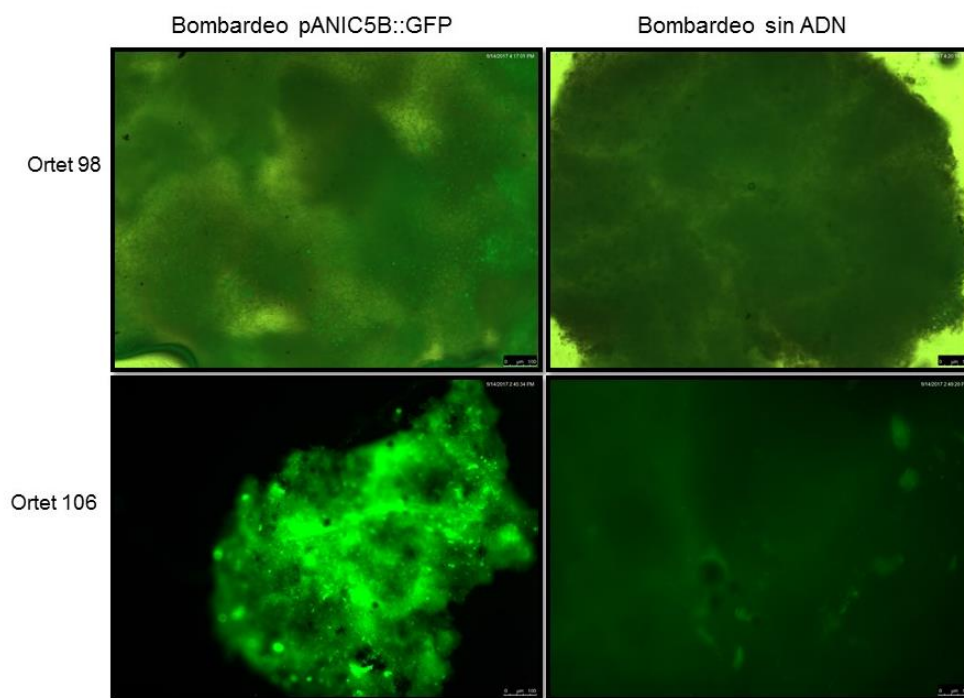


Figura 25. Observación al microscopio de callos bombardeados con pANIC5B::GFP (Ensayo de transformación #1).

Ensayo de transformación # 2 pANIC5B::GFP

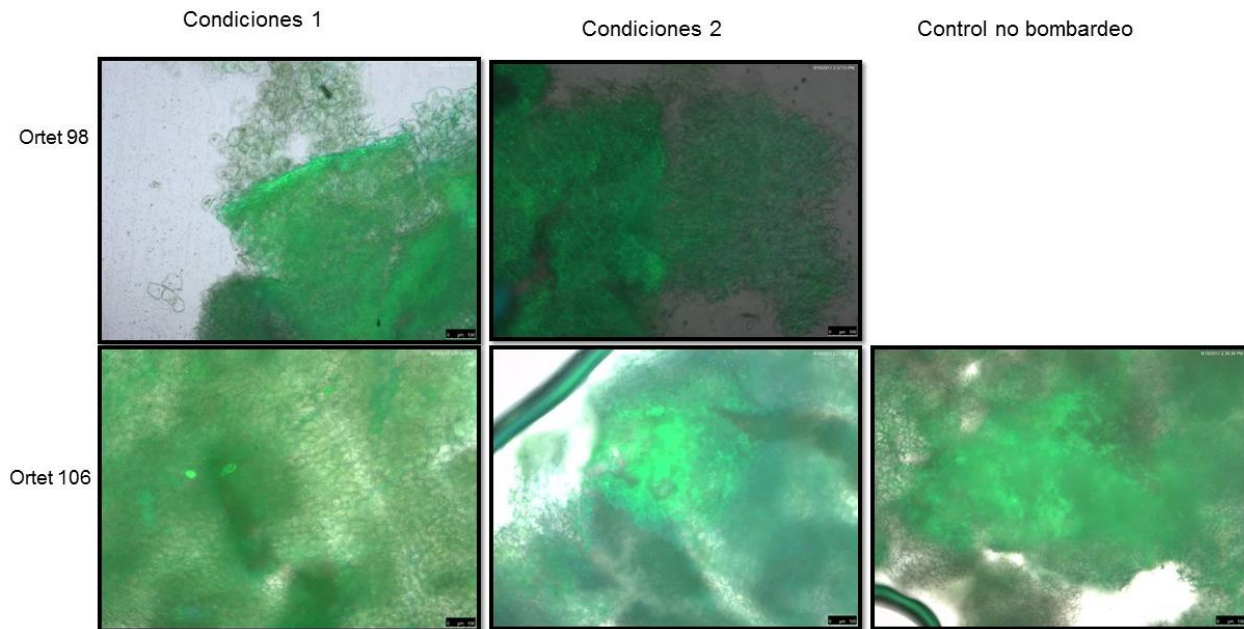


Figura 26. Observación al microscopio de callos bombardeados con pANIC5B::GFP (Ensayo de transformación #2).

Ensayo de transformación # 2 pANIC5B::GFP

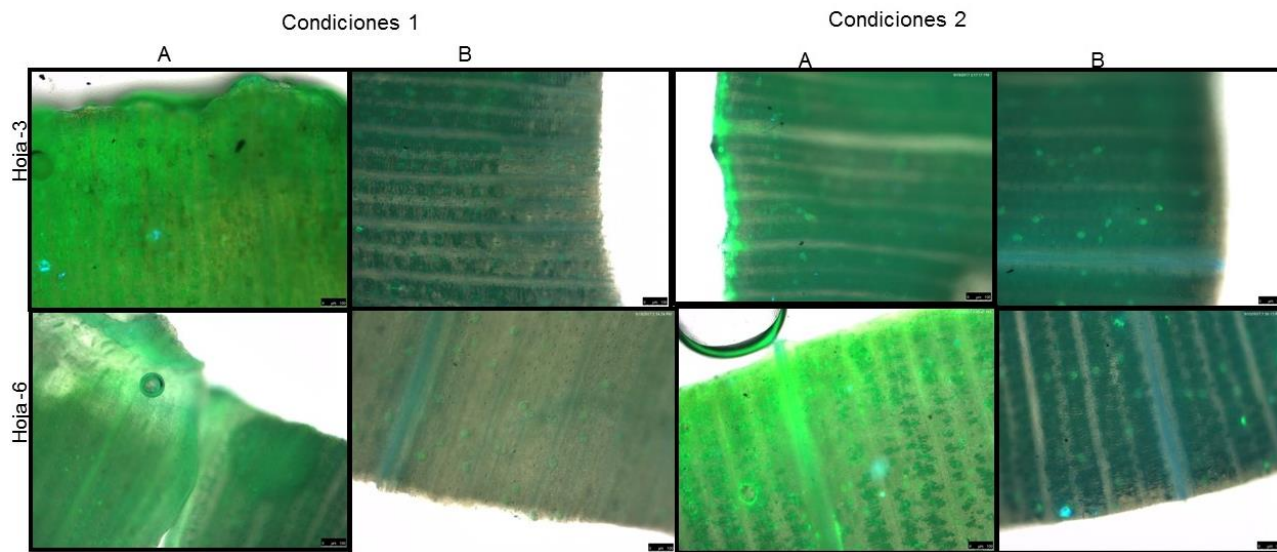


Figura 27. Observación al microscopio de folíolos bombardeados con pANIC5B::GFP (Ensayo de transformación #2).

Ensayos histoquímicos para detectar posible HR.

Tinción DAB.

3,3'-Diaminobencidina (DAB), es un compuesto orgánico derivado del benceno y usado comúnmente en la tinción de ácidos nucleicos y proteínas. Es soluble en agua en su forma no oxidada a pH intracelular, pero cuando es oxidado forma un precipitado color marrón. Por otro lado, los estudios en el rol del peróxido de hidrógeno en el estrés oxidativo y en vías de señalización requieren de métodos de detección confiables, específicos y sensibles, uno de ellos es la detección del H_2O_2 con el DAB. La reacción de ambos forma un polímero insoluble de color marrón, que se precipita instantáneamente en presencia de la enzima peroxidasa (Šnyrychová et al., 2009).

Para observar una posible muerte celular por HR se evaluó el peróxido de hidrógeno retenido como sustrato por el DAB. Debido a que esta molécula es la más directamente involucrada en la muerte celular por HR en la planta (Jabs et al., 1996; Shirasu et al., 1997; Álvarez et al., 1998; Torres et al., 2002). Se obtuvieron los resultados de la Figura 28. Los bombardeos con AvrPto-Pto (efector de *Pseudomonas syringae*) funcionaron como controles positivos de HR, y por esto, los porcentajes de cobertura del precipitado marrón son mayores, tal y como se aprecia en la Figura 28. Los bombardeos con Pto (proteína de resistencia), son a su vez un blanco negativo. Los resultados son variados, y muestran que para el cultivar OxG, hay diferencias significativas entre las afectaciones de cada efector, mostrando mayor muerte celular al ser bombardeado con E2 y E19 ($p=0,026$; $F=0,7187$). El cultivar *E. guineensis* exhibe también ser afectado más por E2 y E19, pero la ANOVA unidireccional no mostró que estos fueran diferentes a E5 ($p=0,522$; $F=0,727$). Los porcentajes en general dejan ver una mayor susceptibilidad al daño por estos efectores en *E. guineensis* (expresado en mayor número de precipitados producto de la reacción del buffer DAB con las ERO $-H_2O_2$ - posibles productos de la actividad del efector), que en el híbrido interespecífico. Al comprobar lo anterior con la comparación de varianzas, se obtuvo que, para el E19, hay diferencias

significativas entre las afectaciones de *E. guineensis* frente a las de OxG ($p=0,003$; $F=4,531$). Sin embargo, con E2 y E5 no es significativa la diferencia de respuesta entre ambos cultivares ($p=0,277$; $F=1,584$ y $p=0,129$; $F=3,643$ respectivamente).

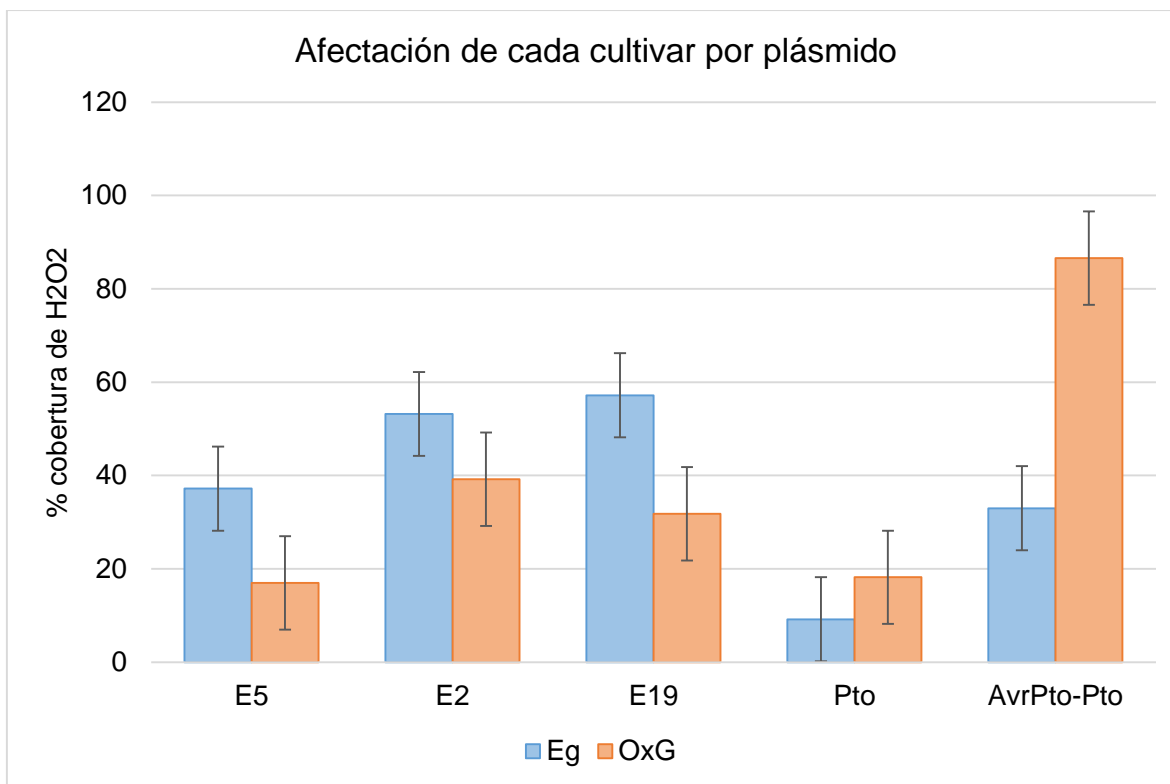


Figura 28. Porcentaje de cobertura de peróxido de hidrógeno de la tinción DAB según cada efector bombardeado.

Los patrones de tinción DAB obtenidos son consistentes con lo esperado, ya que se presentan en los folíolos bombardeados con el efector, y también en los bombardeados sin ADN (debido al daño y muerte celular ocasionada por la fuerza mecánica); pero no en los controles sin bombardeo.

La producción de especies reactivas de oxígeno ya ha sido monitoreada en diversas plantas, como el tabaco y *Arabidopsis*, usando la tinción DAB; como marcadores asociados a la muerte celular durante la HR (Ren et al., 2002; Liu et al., 2007).

A continuación, se observan las imágenes de los ensayos de transformación transitoria del #4 al #13.

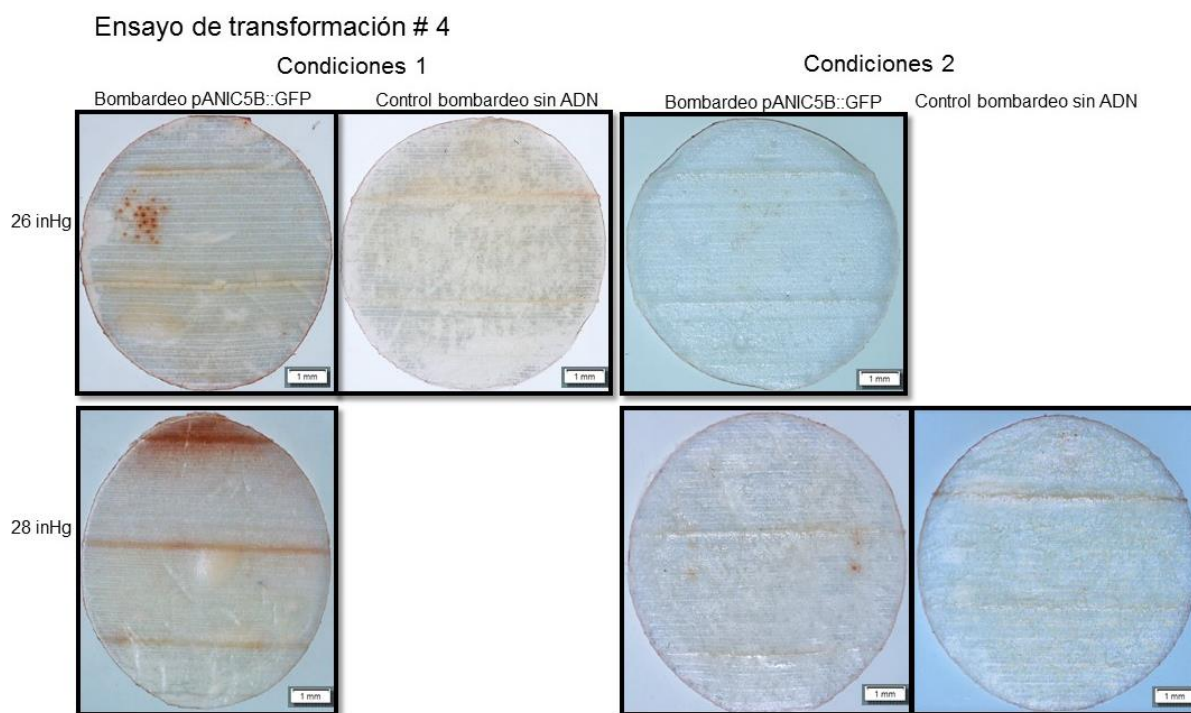


Figura 29. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #4 pANIC5B::GFP.

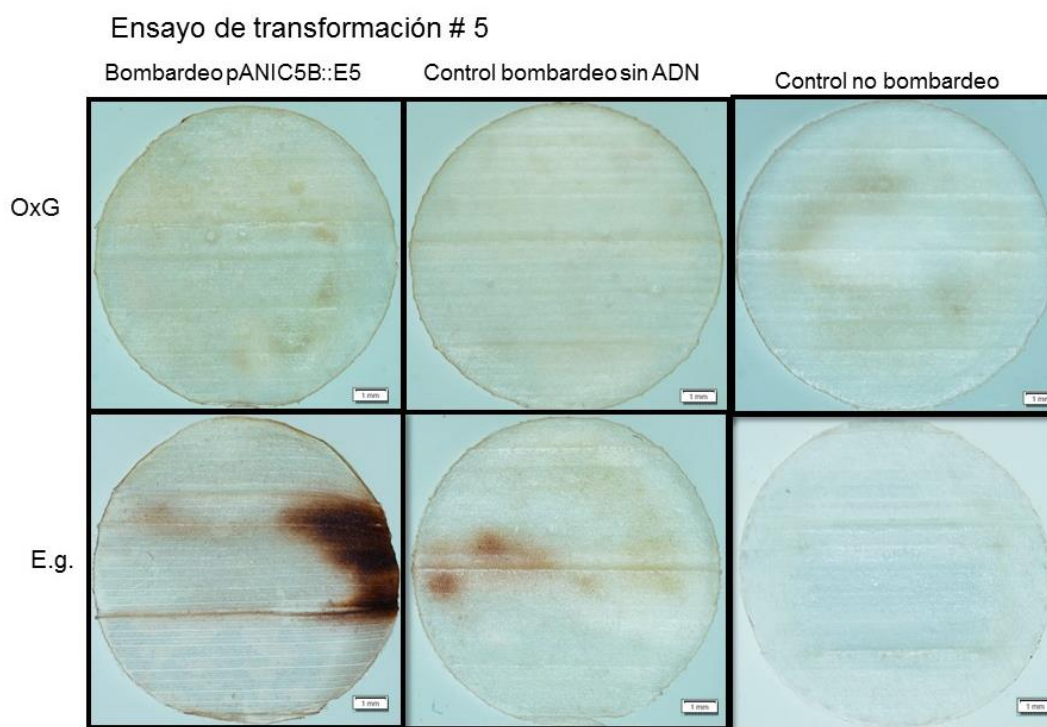


Figura 30. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #5 pANIC5B::E5.

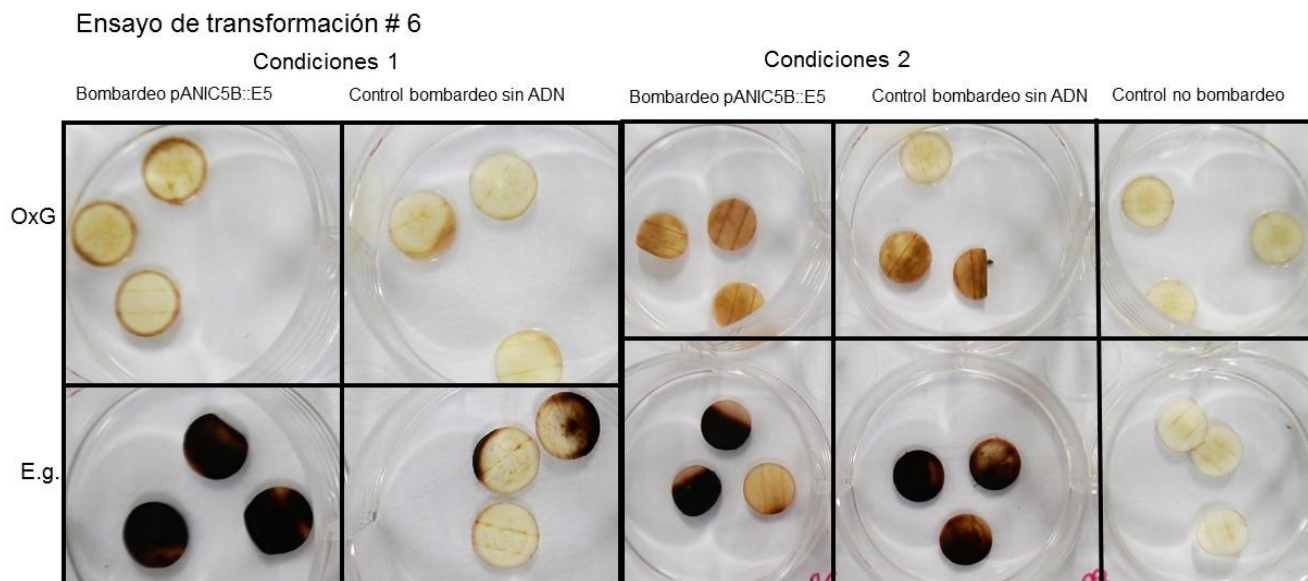


Figura 31. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #6 pANIC5B::E5.

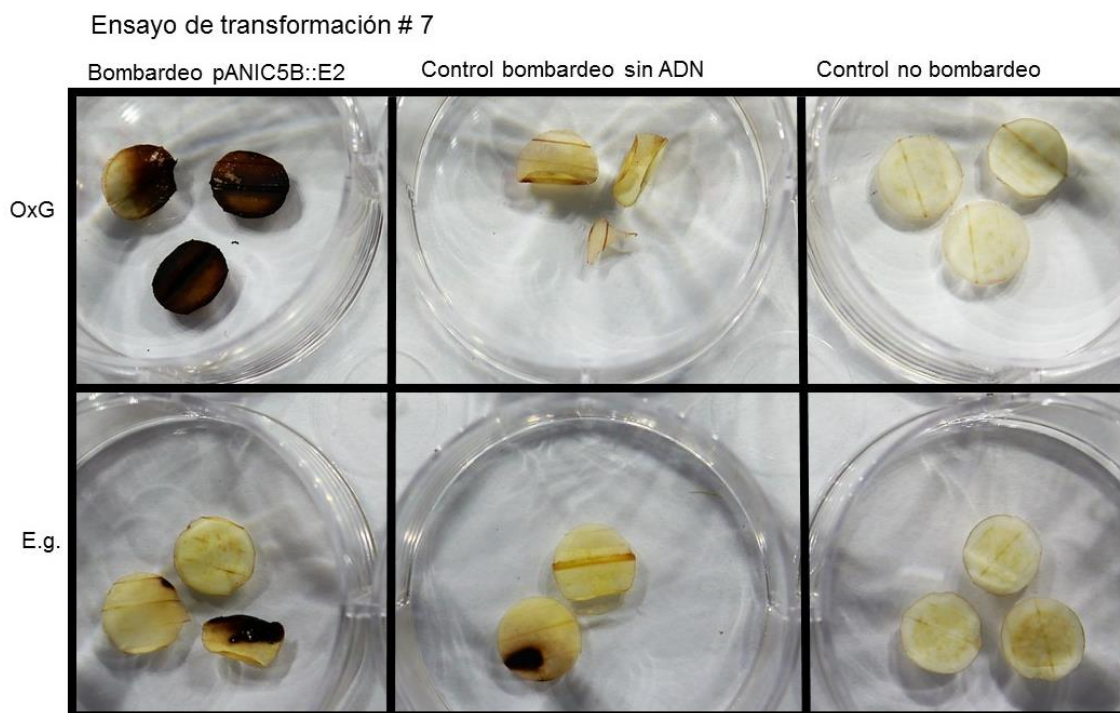


Figura 32. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #7 pANIC5B::E2.

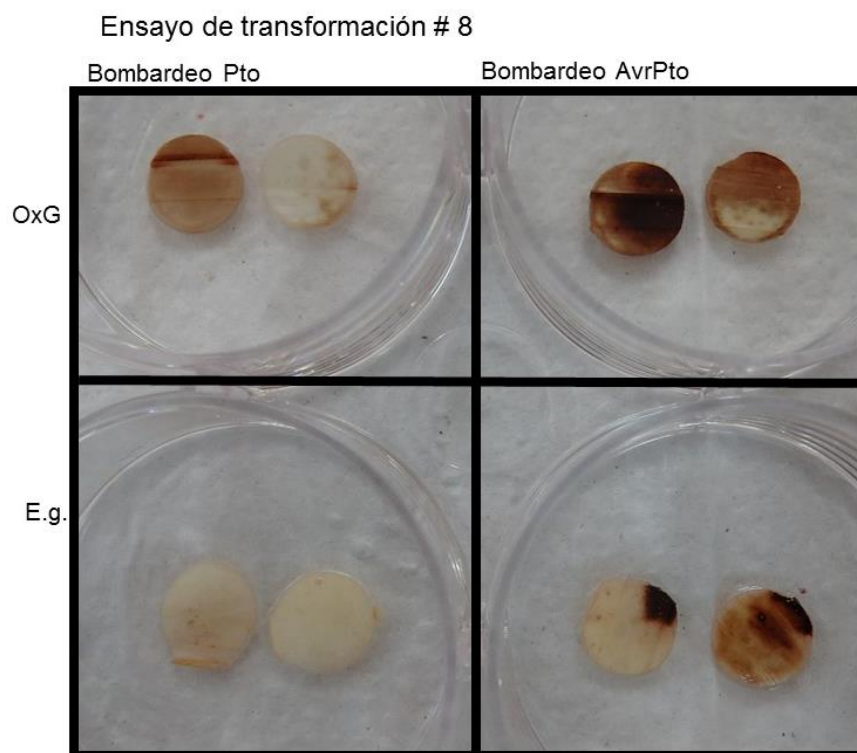


Figura 33. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #8 AvrPto / Pto.

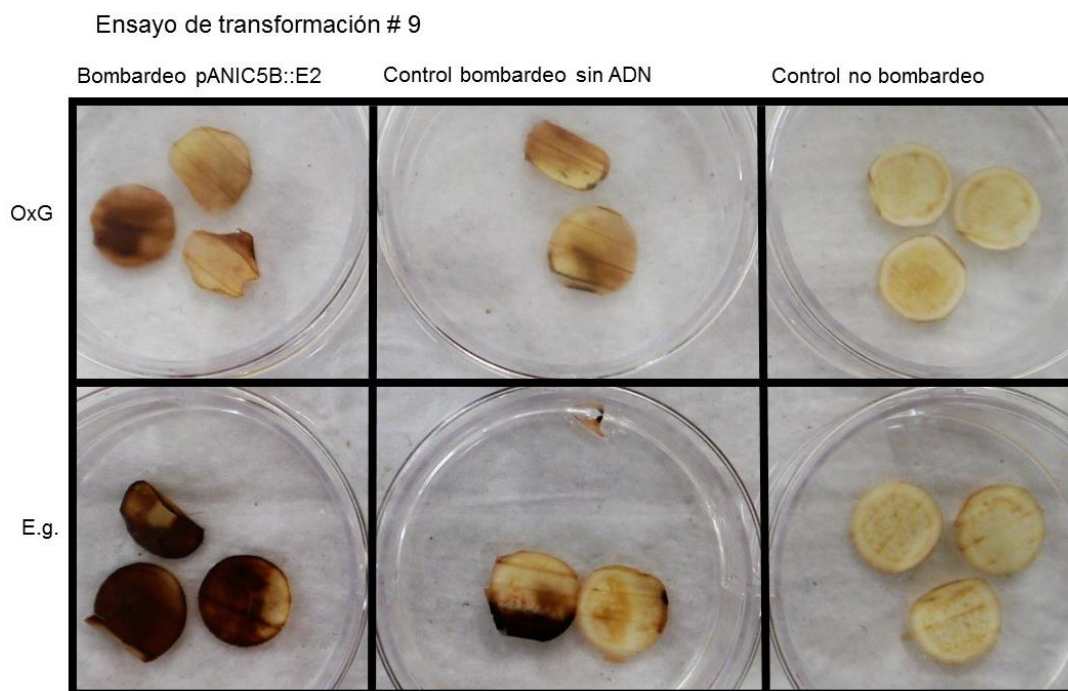


Figura 34. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #9 pANIC5B::E2.

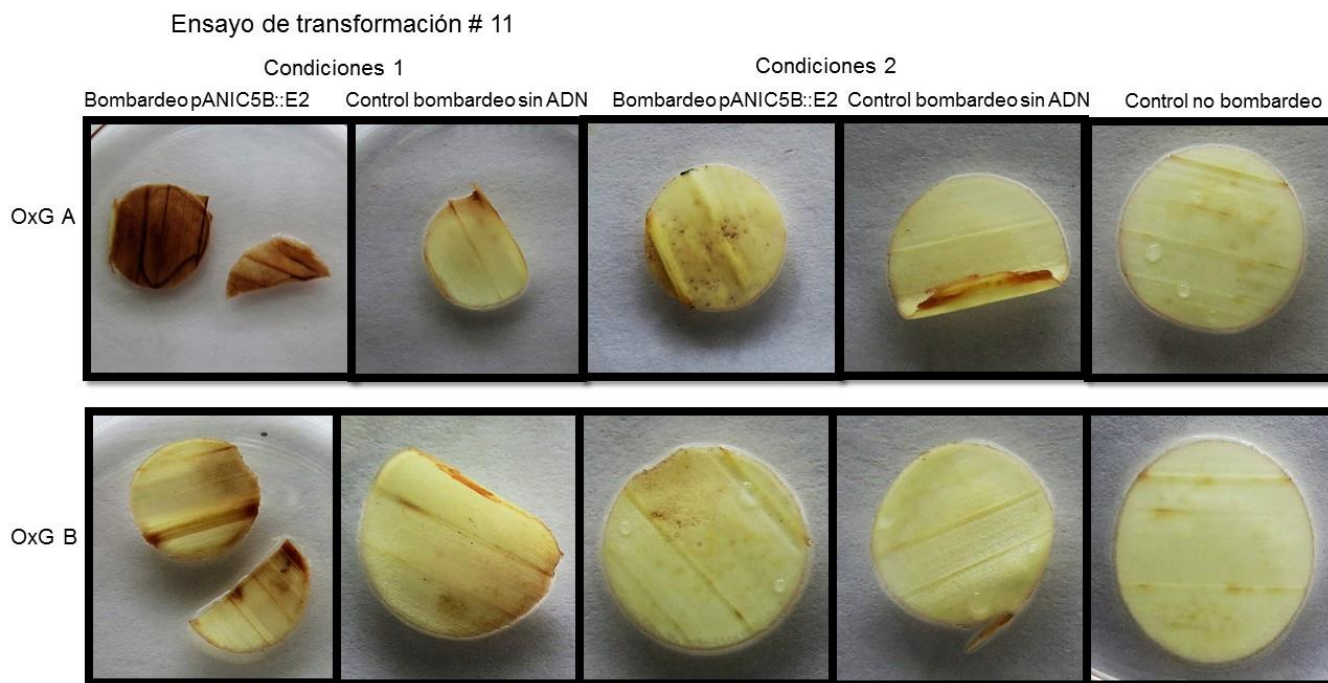


Figura 35. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #11 pANIC5B::E2.

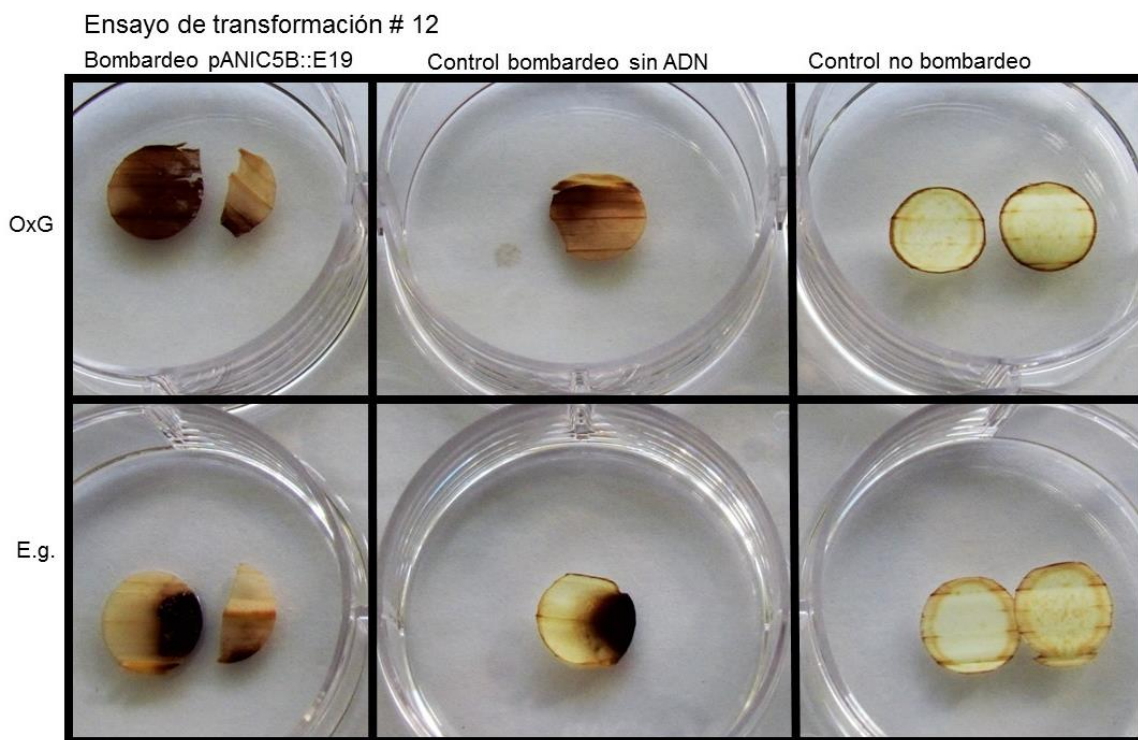


Figura 36. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #12 pANIC5B::E19.

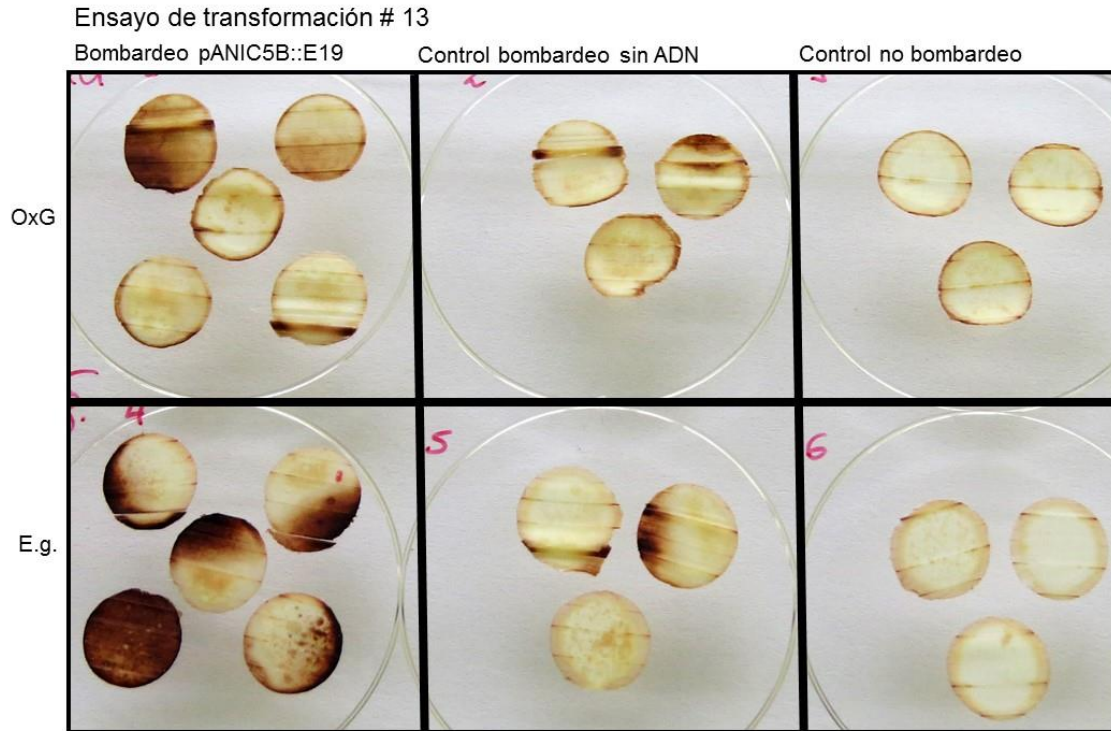


Figura 37. Prueba DAB, detección de peróxido de hidrógeno en ensayo de transformación transitoria #13 pANIC5B::E19.

Prueba NBT.

Durante la interacción planta-patógeno, hay una acumulación rápida y transitoria de especies reactivas de oxígeno, este estallido oxidativo toma lugar luego del reconocimiento del patógeno y es esencial para la respuesta de defensa de la planta; por tanto, los niveles de ERO deben ser un indicativo de la susceptibilidad o resistencia de la planta frente a un patógeno. Aunque el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es la ERO más detectada en las interacciones planta-patógeno (Levine et al., 1994), muchas investigaciones documentan al anión superóxido (O_2^-) como una molécula reguladora clave, ya que este se produce en los estadios tempranos de la interacción, y luego si su producto por dismutación, el H_2O_2 (Jabs et al., 1996; Shirasu et al., 1997; Álvarez et al., 1998; Torres et al., 2002).

La tinción con Nitro blue tetrazolio es ampliamente usada como método para detectar la producción *in situ* de radicales superóxido en los tejidos vegetales (Doke, 1983). Es altamente sensible y específica, siendo así usada en varios tejidos de diferentes especies de plantas (Grellet-Bournonville & Díaz-Ricci, 2011; Salazar et al., 2006). Para observar una posible HR se evaluó el anión superóxido retenido como sustrato por el NBT. Se obtuvieron los resultados de la Figura 38. Los bombardeos con AvrPto-Pto (efector de *Pseudomonas syringae*) funcionaron como controles positivos de muerte celular (HR), y por esto, los porcentajes de cobertura del precipitado azul-violeta son mayores, tal y como se aprecia en la Figura 38. Los bombardeos con Pto (proteína de resistencia), son a su vez un blanco negativo.

Los resultados son variados, y muestran que el cultivar de *E. guineensis* se ve aparentemente afectado en mayor medida por el E19 y E2, sin embargo, la ANOVA de un factor no refleja diferencias significativas frente a E5 ($p=0,551$; $F=0,659$). Por su lado, el cultivar OxG muestra ser afectado nuevamente, mayoritariamente por E19, y menos por el E5; no obstante, de nuevo la prueba ANOVA unidireccional no resulta en diferencias significativas entre las afectaciones ($p=0,600$; $F=0,557$). Los porcentajes en general dejan ver una mayor susceptibilidad al daño por estos efectores en *E. guineensis* (expresado en precipitados producto de la reacción del buffer NBT con las ERO $-O_2^-$ - posibles productos de la actividad del efector), que en el híbrido interespecífico; esta apreciación si fue aceptada al realizar la prueba estadística, mostrando que hay diferencias significativas entre ambos cultivares al ser evaluados con el mismo efector para el caso de E2 ($p=0,002$; $F=5,286$), y E19 ($p=0,045$; $F=8,314$), expresando una mayor afectación en *E. guineensis* y por tanto una posible mayor muerte celular en este cultivar por HR. Por otro lado, el E5 no mostró diferencias significativas en la respuesta de ambos cultivares ($p=0,092$; $F=4,868$).

A continuación, se observan las imágenes de los ensayos de transformación transitoria del #4 al #13.

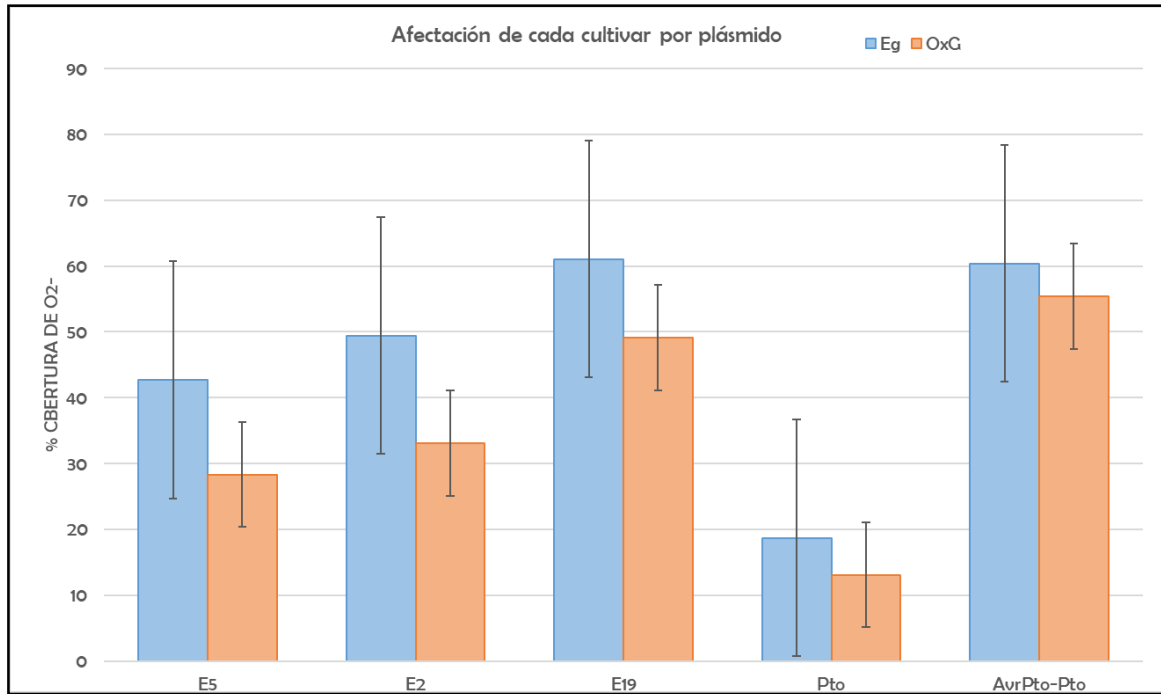


Figura 38. Porcentaje de cobertura de anión superóxido de la tinción NBT según efector bombardeado.

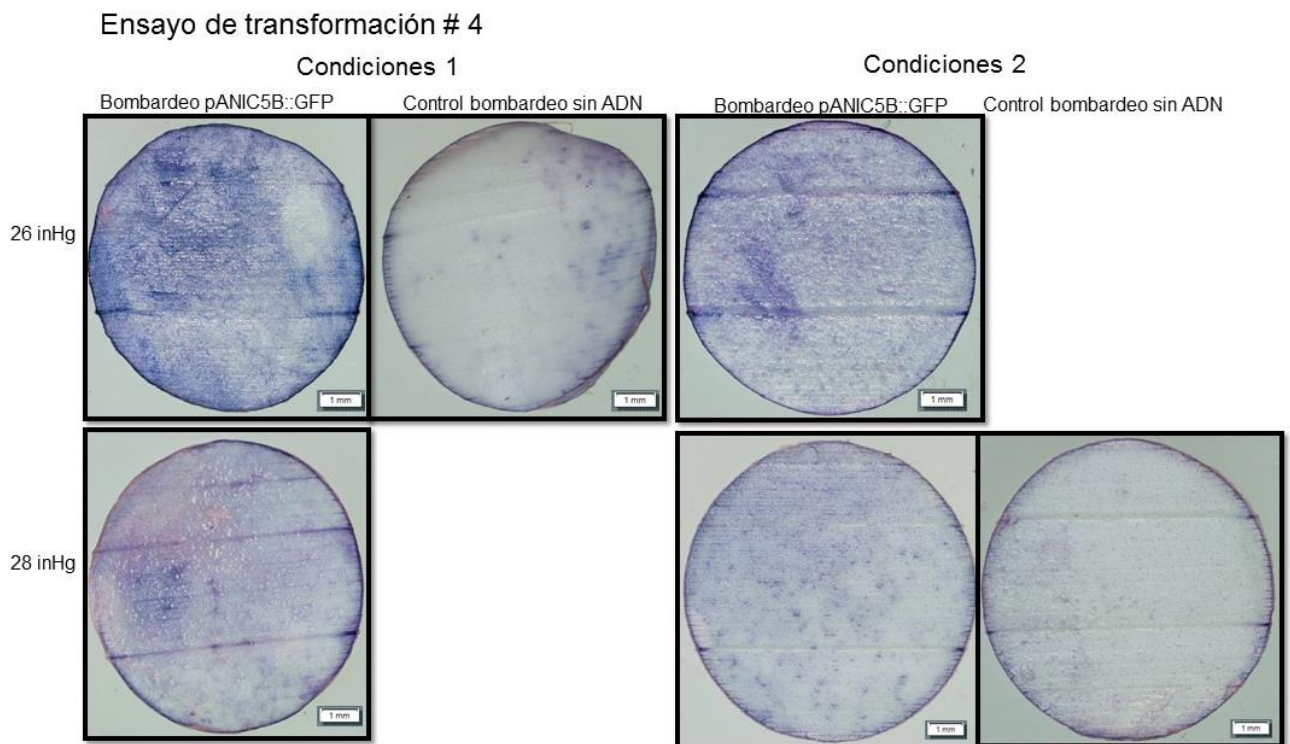


Figura 39. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #4 pANIC5B::GFP.

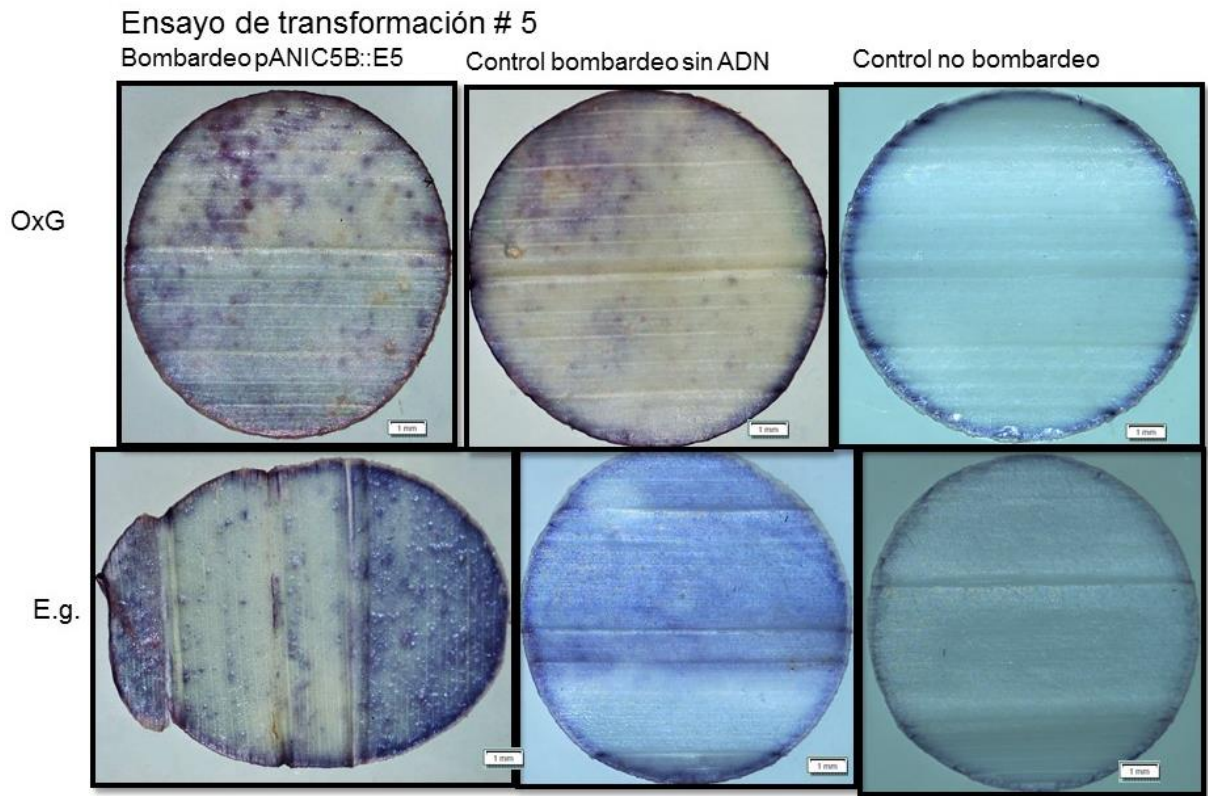


Figura 40. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #5 pANIC5B::E5.

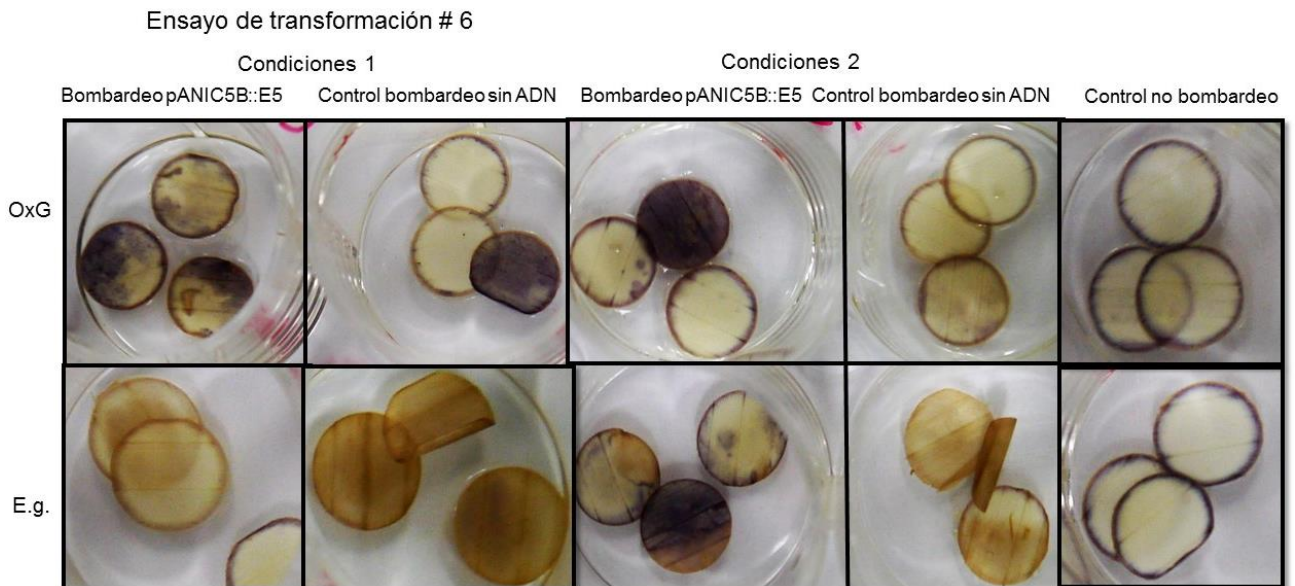


Figura 41. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #6 pANIC5B::E5.

Ensayo de transformación # 7

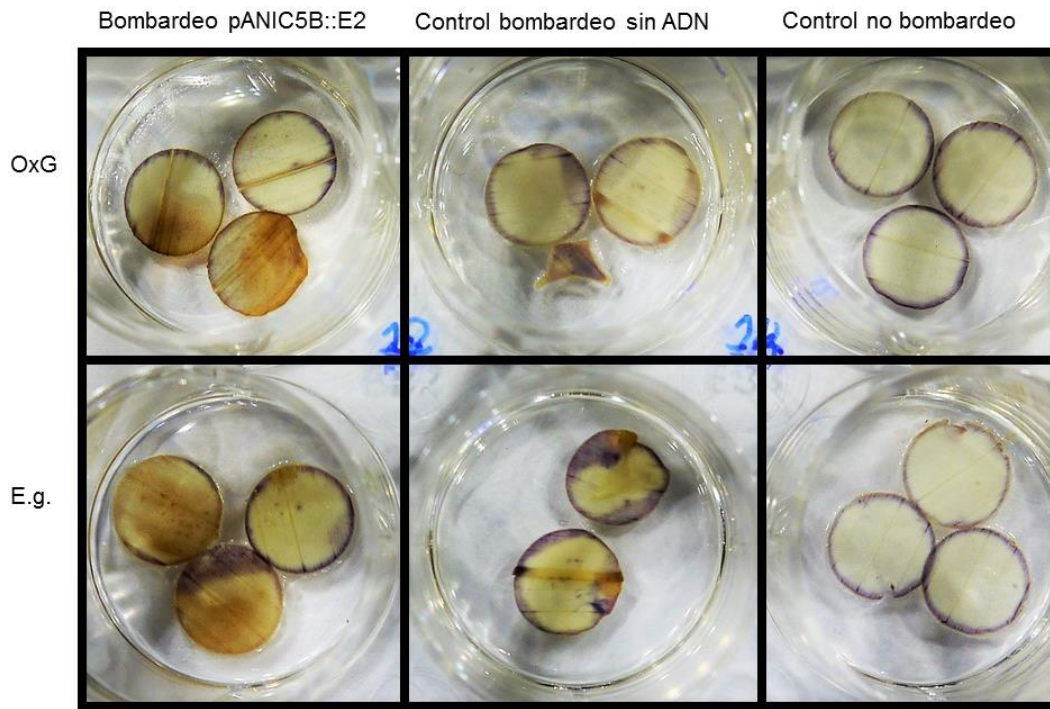


Figura 42. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #7 pANIC5B::E2.

Ensayo de transformación # 8



Figura 43. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #8 AvrPto / Pto.

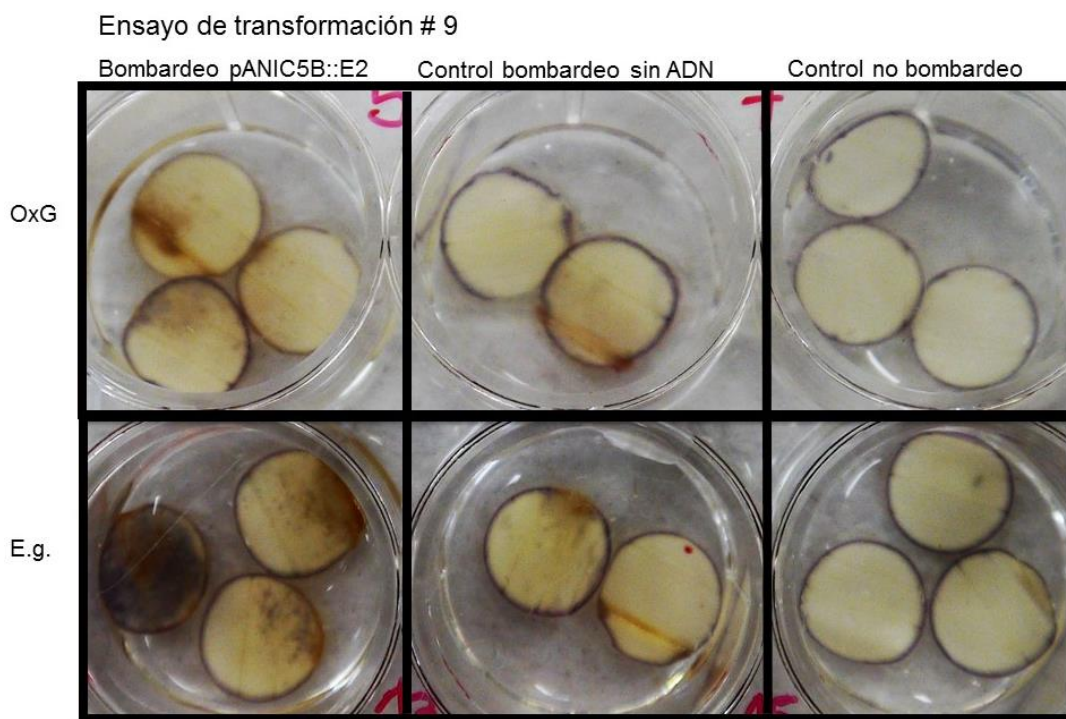


Figura 44. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #9 pANIC5B::E2.

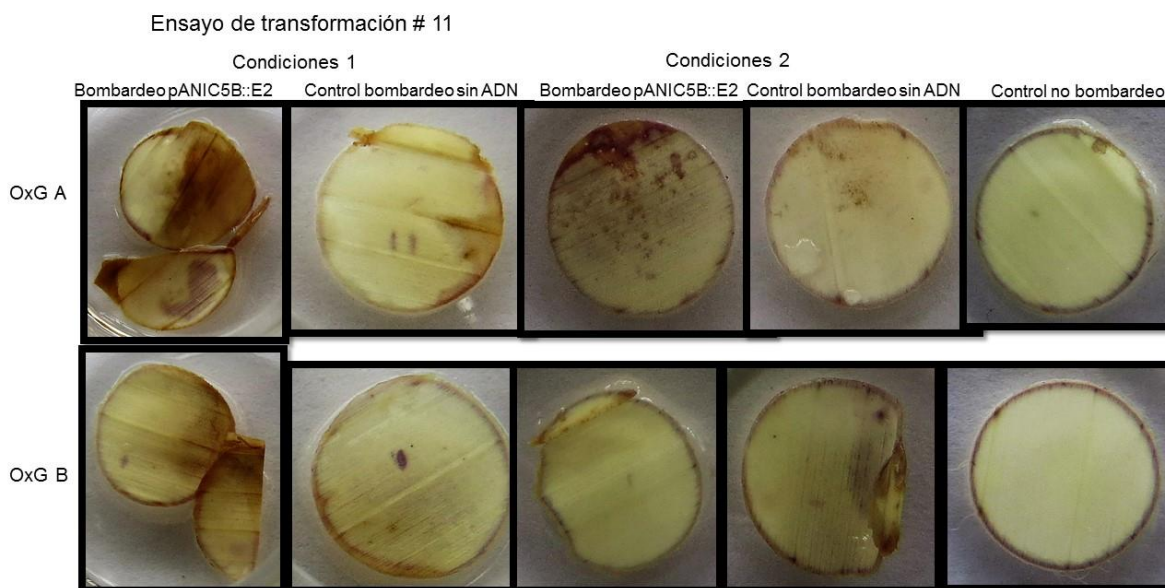


Figura 45. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #11 pANIC5B::E2.

Ensayo de transformación # 12

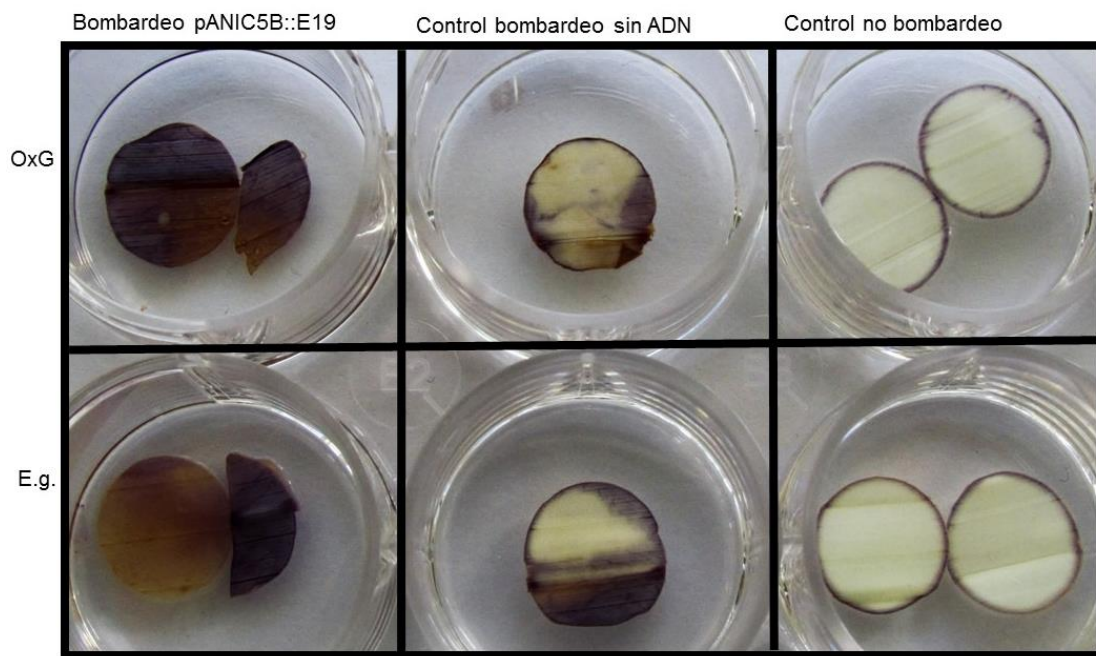


Figura 46. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #12 pANIC5B::E19.

Ensayo de transformación # 13

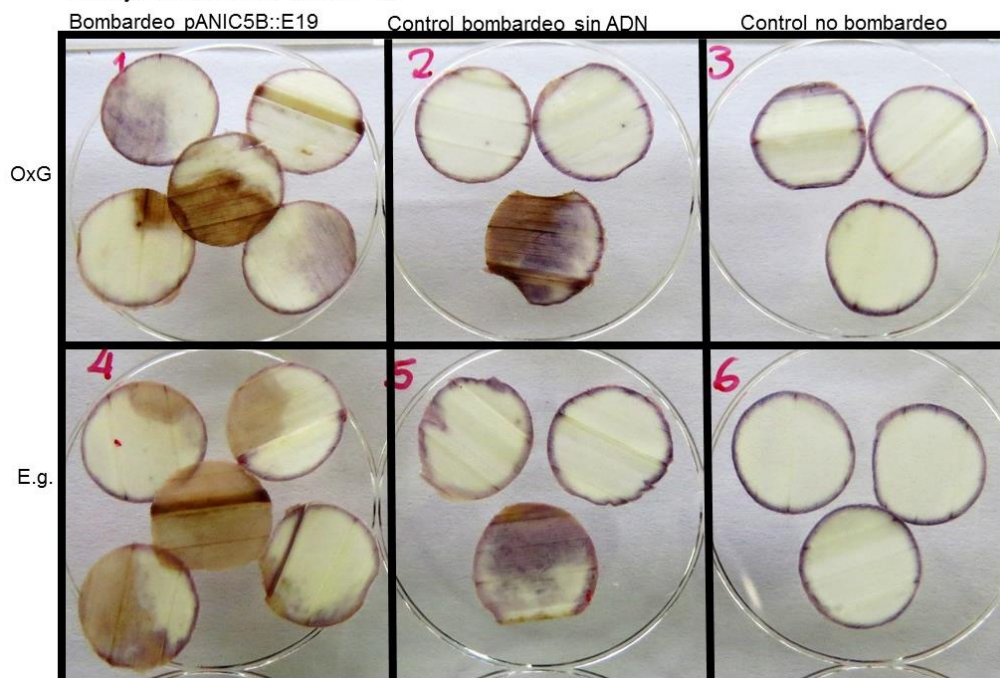


Figura 47. Prueba NBT, detección de anión superóxido en ensayo de transformación transitoria #13 pANIC5B::E19.

CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar el proceso de expresión transitoria a través de bombardeos por biobalística del vector pANIC5B::GFP y de tres efectores o proteínas de virulencia de *Phytophthora palmivora* (pANIC5B::E2, pANIC5B::E5 y pANIC5B::E19) en folíolos negativos de dos cultivares de palma de aceite, uno de *Elaeis guineensis* y otro del híbrido OxG. Esto se alcanzó hallando la combinación de factores físicos y biológicos adecuada para cada uno.
- Se estimó la eficiencia de transformación transitoria mediante el gen reportero *GUSPlus*, al contar el número de precipitados obtenidos y someter estos datos a pruebas paramétricas.

APRECIACIONES FINALES

- De manera preliminar, se observó que la proteína efectora E19, causó mayor presencia de ERO en ambos cultivares (*E. guineensis* y OxG), a lo largo de los ensayos de transformación transitoria, siendo así la causante de la mayor afectación al ser evaluada bajo las dos pruebas histoquímicas (DAB y NBT). Sin embargo, hubo diferencias significativas entre los precipitados hallados en cada cultivar, indicando que en *E. guineensis* hay una mayor muerte celular.
- Se obtuvo que la proteína efectora E2, ocasiona un daño intermedio en ambos tejidos, siendo significativamente mayor en *E. guineensis* según el ensayo NBT.
- Se distinguió a la proteína efectora E5, como la menos incidente sobre el tejido OxG y *E. guineensis* para ambas tinciones. Este efector no mostró diferencias significativas al afectar cada cultivar, lo que de cierto modo indica que causa un daño similar en ambos.

RECOMENDACIONES

- La microscopía con el gen fluorescente *GFP* no mostró ser adecuada para el seguimiento y evaluación de la transformación en el callo, ya que este tejido mostró fluorescencia por sí solo. Por lo que no se recomienda usar como marcador de transformación.
- Para trabajos futuros se recomienda realizar un mayor número de eventos independientes de transformación transitoria para de este modo robustecer la investigación con un tratamiento estadístico más apropiado.
- Es recomendable evaluar las demás proteínas de virulencia caracterizadas en la interacción del patógeno *Phytophthora palmivora* con el hospedero, ya que, tres efectores no son suficientes para seleccionar materiales resistentes a una enfermedad que posiblemente es poligénica.

PRODUCTOS

- Se estableció un POE (Protocolo Operativo Estandarizado) para realizar expresión transitoria del vector pANIC5B::GFP y de tres efectores o proteínas de virulencia de *Phytophthora palmivora* (pANIC5B::E2, pANIC5B::E5 y pANIC5B::E19), y, para evaluar dicha expresión por medio de dos pruebas histoquímicas (DAB y NBT).

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, R., Zainal, A., Heng, W.Y., Li, L.C., Beng, Y.C., Phing, L.M., Sirajuddin, S.A., Ping, W.Y.S. & Joseph, J.L. (2005). Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 24-34.
- Ahlandsberg, S., Sathish, P., Sun, C., & Jansson, C. (2001). A set of useful monocotyledon transformation vectors. *Biotechnology Letters*, 23 (22), 1871–1875.
- Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., Datta, K., Datta, S., Philip, J., Dix, P., Fauque, C., Huang, N., Kohli, A., Mooibroek, H., Nicholson, L., Nguyen, T., Nugent, G., Raemakers, K., Romano, A., Somers, D., Stoger, E., Taylor, N., Visser, R. (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, 15, 305-327. <http://doi.org/10.1007/s11032-004-8001-y>.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., & Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92, 773–784.
- Arias, D., González, M., Prada, F., Restrepo, E., & Romero, H. (2013). Morpho-agronomic and molecular characterisation of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. material from Angola. *Tree Genetics & Genomes*, 9 (5), 1283–1294. <http://doi.org/10.1007/s11295-013-0637-5>.
- Ariza, J.G., Sarria, G.A., Torres, G.A., Varón, F. y Martínez, G. (2008). Relación entre los síntomas externos y el avance interno de la lesión causada por la Pudrición del cogollo (PC) en palmas de vivero en Tumaco. *Fitopatología Colombiana*, 32 (2), 35-38.
- Bahariah, B., Parveez, G.K.A., Yunus, A.M.M., Masura, S.S., Khalid, N., & Othman, R.Y. (2013). Biolistic transformation of oil palm using the phosphomannose

- isomerase (*pmi*) gene as a positive selectable marker. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 295–304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.08.004>.
- Basiron, Y. (2005). Palm Oil. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/047167849X.bio071>.
- Basiron, Y. (2007). Palm oil production through sustainable plantations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109 (4), 289–295. <http://doi.org/10.1002/ejlt.200600223>.
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signaling. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1229–1240.
- Belhaj, K., Cano, L.M., Prince, D.C., Kemen, A., Yoshida, K., Dagdas, Y.F., Etherington, G.J., Schoonbeek, H., van Esse, H.P., Jones, J.D.G., Kamoun, S., & Schornack, S. (2017). Arabidopsis late blight: infection of a nonhost plant by *Albugo laibachii* enables full colonization by *Phytophthora infestans*. *Cellular Microbiology*, 19(1), e12628. <http://doi.org/10.1111/cmi.12628>.
- Benítez, É., & García, C. (2015). The history of research on oil palm bud rot (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Agronomía Colombiana*, 32 (3), 390–398. <http://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n3.46240>.
- Bernal N., F. (2001). El cultivo de la palma de aceite y su beneficio. Guía general para el nuevo palmicultor. Bogotá: Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite, Fedepalma, y Centro de Investigación en Palma de Aceite.
- Bespalhok F., J.C., & Hattori, K. (1997). Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (BERT.) BERTONI floret explants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 9(3), 185-188.
- Betancourth, C., Peña, E., & Reyes, R. (2011). Predicción y control de la cosecha en el híbrido interespecífico *Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis* en la zona palmera occidental de Colombia. *Revista Corpoica*, 12 (1).

- Bos, J.I.B., Armstrong, M.R., Gilroy, E.M., Boevink, P.C., Hein, I., Taylor, R.M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R.R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S.C., Kamoun, S., & Birch, P.R.J. (2010). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 107 (21), 9909–9914. <http://doi:10.1073/pnas.0914408107>.
- Carter, C., Finley, W., Fry, J., Jackson, D., & Willis, L. (2007). Palm oil markets and future supply. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 307–314. <http://doi.org/10.1002/ejlt.200600256>.
- Catanzariti, A.M., Dodds, P.N., & Ellis, J.G. (2007). Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, 269, 181–188.
- Chalfie, M., Euskirchen, G., Ward, W.W., & Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263, 802-805.
- Chavez, M., Valadez, M., Carrillo, G., & Lozoya, G. (2002). Expresión transitoria del gen de la β -Glucuronidasa y efecto del bombardeo en tejido de crisantemo (*Dendrathera grandiflorum*). *Horticultura*, 8 (1), 107-121.
- Chowdhury, M. K. U. , Parveez G. K. A., & Saleh, N.M. (1997). Evaluation of five promoters for use in transformation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Reports*, 16, 277-281.
- Christen, J., & Hohl, H.R. (1972). Growth and ultrastructural differentiation of sporangia in *Phytophthora palmivora*. *Canadian Journal of Microbiology*, 18, 1959-1964.
- Connett, M., Tran, T., Jefferson, R., & Kilian, A. (2006). Transactivation lines in rice evaluation of insertional mutants and development of effective transactivator platform for FTO and co-ordinate gene expression. A report for the *Rural Industries Research and Development Corporation*.

- Dangl, J.L., & Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826–833.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M., & Bolwell, G.P. (2012). The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in *Arabidopsis* Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity. *The Plant Cell*, 24, 275–287.
- Daudi, A., & O'Brien, J. A. (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *Bio-protocol*, 2(18), 263. <http://doi.org/10.21769/BioProtoc.263>.
- Deslandes, L., & Rivas, S. (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science*, 17 (11), 644–55. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.011>
- Díaz G., C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61. Retrieved October 23, 2017, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000100007&lng=en&tlng=es.
- Dodds, P.N., & Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11, 539–548.
- Doke, N. (1983). Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology*, 23, 359–367.
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Chen, Y., Wang, Q., Wang, X., Jiang, R.H.Y., Arredondo, F.D., Anderson, R.G., Thakur, P.B., McDowell, J.M., Wang, Y., & Tyler, B. M. (2008a). Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *The Plant Cell*, 20 (April), 1118–1133. <http://doi.org/10.1105/tpc.107.057067>.

- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X., & Tyler, B.M. (2008b). RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *The Plant Cell*, 20, 1930–1947. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.056093>.
- Drenth, A., & Sendall, B. (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. Brisbane (Australia): CRA for Tropical Plant Protection. 41p.
- Drenth, A., Torres, G. A., & Martínez, G. (2013). Pudrición del cogollo en la palma de aceite. *Palmas*, 34, 87–94.
- Du, J., & Vleeshouwers, V.G.A.A. (2014). The do's and don'ts of effectoromics. En: Birch, P., Jones, J., & Bos, J. (eds), Plant-Pathogen Interactions. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 1127. Humana Press, Totowa, NJ.
- Elliott, M.L., & Uchida, J.Y. (2004). Diseases and disorders of ornamental palms. En Elliott, M.L., Broschat, T.K., Uchida, J.Y., & Simone, G.W. (eds.), *Compendium of Ornamental Palm Diseases and Disorders*, American Phytopathological Society (APS Press). <http://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2004-0304>.
- Erwin, D.C., & Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. St Paul, Minesota: The American Phytopathological Society.
- Evangelisti, E., Gogleva, A., Hainaux, T., Doumane, M., Tulin, F., Quan, C., Yunusov, T., Floch, K., & Schornack, S. (2017). Time-resolved dual transcriptomics reveal early induced *Nicotiana benthamiana* root genes and conserved infection-promoting *Phytophthora palmivora* effectors. *BMC Biology*, 15 (39), 1-24.
- Fawke, S., Doumane, M., & Schornack, S. (2015). Oomycete Interactions with Plants: Infection Strategies and Resistance Principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79 (3), 263-280. DOI 10.1186/s12915-017-0379-1.
- Gharanjik, S., Moieni, A., Mousavi, A., & Alizadeh, H. (2008). Optimization of

- transient expression of *uidA* gene in androgenic embryos of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Falat) via particle bombardment. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6 (4), 207-213.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 43, 205–227.
- Grellet-Bournonville, C.F., & Díaz-Ricci, J.C. (2011). Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. *Phytochemical Analysis*, 22, 268–271. DOI 10.1002/pca.1275.
- He, P., Shan, L., & Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microbiology*, 9, 1385–1396. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00944.x>.
- Heim, R., Prasher, D.C., & Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutation and post-translational modification of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 12501-12504.
- Helenius, E., Boije, M., Niklander, T., Tapio, P., & Teeri, T. (2000). Gene delivery into intact plants using the Helios™ Gene Gun. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18, 2870–2871.
- Henry, G., Thonart, P., Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 16, 257–268.
- Hu, C.Y., Chee, P.P., Chesney, R.H., Zhou, J.H., & Miller, P.D. (1990). Intrinsic *GUS*-like activities in seed plants. *Plant Cell Reports*, 9, 1–5.
- Hückelhoven, R., & Kogel K. H. (1998). Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11 (4), 292–300.

- Izawati, A.M.D., Parveez, G.K.A. & Masani, M.Y.A. (2009). Transformation of oil palm using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal oil palm research*, 21, 643-652.
- Jabs, T., Dietrich, R.A., & Dangl, J.L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, 273, 1853–1856.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1997). Elicitor stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 94, 4800-4805.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H., Petnicki-ocwieja, T., Chen, S., & Tang, X. (2004). Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *The Plant Journal*, 37, 554–565. <http://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01982.x>.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., & Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6 (13), 3901-3907.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444 (November), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kale, S. D., & Tyler, B. M. (2011). Assaying effector function in planta using double-barreled particle bombardment. En McDowell J.M. (ed.), *Plant Immunity: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 712, 153–172, Springer. http://doi.org/10.1007/978-1-61737-998-7_13.
- Kamoun, S. (2007). Groovy times: Filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion Plant Biology*, 10, 358–365.
- Kamoun, S., Segretin, M. E., & Schornack, S. (2012). Late blight resistance genes. En: Google Patents.
- Kanchanapoom, K., Nakkaew, A., Kanchanapoom K., & Phongdara, A. (2008). Determination of the most efficient target tissue and helium pressure for biolistic

- transformation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30 (2), 153-157.
- Kikkert, J.R. (1993). The Biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 221-226.
- Klein, T.M., Goff, S.A., Roth, B.A., & Fromm, M.E. (1990). Applications of the Particle Gun in Plant Biology. En: Nijkamp, H.J.J., vanderPlas, L.H.W., & van Aartrijk, J. (eds.), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 56-66.
- Kuriakose, B., Du Toit, E.S., & Jordaan, A. (2012). Transient gene expression assays in rose tissues using a Bio-Rad Helios® hand-held gene gun. *South African Journal of Botany*, 78, 307-311. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.06.002>
- Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E., & Hohtola, A. (2000). Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of *Scots pine* callus derived from mature buds. *Tree Physiology*, 20, 467–475.
- Lee, M.P., Yeun, L.H. & Abdullah, R. (2006). Expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic oil palm. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 117-126.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., & Lamb, C.J. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell*, 79, 583-593.
- Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W., & Zhang, S. (2007). Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal*, 51, 941–954. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03191.x.
- Loeb, T.A., Reynolds, T.L. (1994). Transient expression of the *uidA* gene in pollen embryoids of wheat following microprojectile bombardment. *Plant Science*, 104:

- López-López, K., Rodríguez-Mora, D., & Vaca-Vaca, J. (2013). Optimización de las condiciones de inoculación por biobalística de un *Begomovirus* en tomate y tabaco. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XV (2), 8-17.
- Lu, S., Gu, H., Yuan, X., Wang, X., Wu, A.M., Qu, L., & Liu, J. (2007). The *GUS* reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions for tissue-specific and inducible expression in transgenic *Arabidopsis*. *Transgenic Research*, 16, 177–191.
- Majid, N.A., & Parveez, G.K.A. (2007). Evaluation of green fluorescence protein (GFP) as a selectable marker for oil Palm transformation via transient expression. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 15, 1-8.
- Majid, N.A., & Parveez, G.K.A. (2016). Regeneration of transgenic oil palm carrying GFP gene used as a visual selectable marker. *Journal of Oil Palm Research*, 28, 4, 415-430.
- Mann, D. G. J., LaFayette, P. R., Abercrombie, L. L., King, Z. R., Mazarei, M., Halter, M. C., Poovaiah, C. R., Baxter, H., Shen, H., Dixon, R. A., Parrott, W. A., & Stewart Jr, C. N. (2012). Gateway-compatible vectors for high-throughput gene functional analysis in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and other monocot species. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 226–236.
- Martínez, G. (2009). Identificación temprana y manejo integrado de la enfermedad Pudrición del cogollo. *Palmas*, 30 (2), 63–77.
- Martínez, G., Sarria, G. A., Torres, G. A., & Varón, F. (2010). *Phytophthora palmivora* es el agente causal de la Pudrición del Cogollo de la palma de aceite. *Palmas*, 31, 334–344.
- Mariani, T.S., Ermavitalini, D., Mitsutaka, T., Chia, T.F., & Miyake, H. (2015). *GUS* gene expression in somatic embryo of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Asian*

- Masani, M.Y.A. (2013). Development of a protoplast-based transformation system for genetic engineering of oil palm. Tesis de maestría. Universidad Técnica de Aquisgrán, Aquisgrán, Alemania.
- Masura, S.S., Parveez, G.K.A., & Ismail, I. (2010). Isolation and characterization of oil palm constitutive promoter derived from ubiquitin extension protein (*uep1*) gene. *New Biotechnology*, 27 (4), 289-299.
- Masura, S.S., Parveez, G.K.A., & Low E. T., L. (2011). Isolation and characterization of an oil palm constitutive promoter derived from a translationally control tumor protein (*TCTP*) gene. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 701-708.
- Mayes, S., Jack, P.L., Marshall, D. F., & Corley, R.H.V. (1997). Construction of a RFLP genetic linkage map for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome*, 40, 116-122. (Julio, 2017). <http://doi.org/10.1139/g97-016>.
- McCabe, D., & Christou, P. (1993). Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELL TM technology). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 227-236.
- Mehrotra, S., & Goyal, V. (2012). *Agrobacterium*-mediated gene transfer in plants and biosafety considerations. *Applied Biochemical Biotechnology*, 168, 1953–1975. DOI 10.1007/s12010-012-9910-6.
- Meunier, J. (1991). Una posible solución genética para el control de la pudrición de cogollo en la palma aceitera. *Palmas*, 12 (2), 39–42.
- Morel, J., & Dangl, J. L. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death & Differentiation*, 4, 671–683. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400309>.
- Mousavi, M., Mousavi, A., Habashi, A.A., & Dehsara, B. (2014). Genetic transformation of date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. 'Estamaran') via particle bombardment. *Molecular Biology Reports*. DOI: 10.1007/s11033-014-3720-6.

- Murphy, D.J. (2003). Working to improve the oil palm crop. *Inform International News on Fats, Oil and Related Materials*, 14 (11), 670-671.
- Nagy, N.E., Franceschi, V.R., Kvaalen, H., & Solheim, H. (2005). Callus cultures and bark from Norway spruce clones show similar cellular features and relative resistance to fungal pathogens. *Trees*, 19, 694–702. DOI 10.1007/s00468-005-0433-4.
- Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology*, 22 (2), 119–125.
- Oh, S., Young, C., Lee, M., Oliva, R., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Win, J., Bos, J.I.B., Liu, H., van Damme, M., Morgan, W., Choi, D., Van der Vossen, E.A.G., Vleeshouwers, V.G.A.A., & Kamoun, S. (2009). *In planta* expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein Rpi-blb2. *The Plant Cell*, 21, 2928–2947.
- Omidvar, V., Siti Nor Akmar, A., Marziah, M., & Maheran, A. A. (2008). A transient assay to evaluate the expression of polyhydroxybutyrate genes regulated by oil palm mesocarp-specific promoter. *Plant Cell Rep*, 27, 1451–1459. <http://doi.org/10.1007/s00299-008-0565-2>.
- Pais, M., Win, J., Yoshida, K., Etherington, G. J., Cano, L. M., Raffaele, S., Banfield, M.J., Jones, A., Kamoun, S., & Saunders, D. G. O. (2013). From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. *Genome Biology*, 14, 211, 1–10.
- Parveez, G.K.A. (2000). Production of transgenic oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using biolistic techniques. En: Jain, S.M., & Minocha, S.D. (eds.), *Molecular Biology of Woody Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 327-350.
- Parveez, G.K.A., & Majid, N.A. (2008). Factors affecting green fluorescence protein (GFP) gene expression in oil palm after microprojectile bombardment mediated

- transformation. *Journal of Oil Palm Research*, 20, 495-507.
- Parveez, G.K.A., & Bahariah, B. (2012). Biolistic-mediated production of transgenic oil palm. En: Dunwell, J.M., & Wetten, A.C. (eds.), *Transgenic Plants: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 847, Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-558-9_14.
- Parveez, G.K.A, Chowdhury, M.K.U., & Salehb N.M. (1997). Physical parameters affecting transient GUS gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using the biolistic device. *Industrial Crops and Products*, 6, 41-50.
- Parveez, G.K.A., Masri, M.M., Zainal, A., Majid, N.A., Yunus, A.M.M., Fadilah, H.H., Rasid, O., & Cheah, S. (2000) Transgenic oil palm : production and projection. *Biochemical Society Transactions*, 28 (6), 969-971.
- Peixe, A., Barroso, J., Potes, A., & Pais, M.S. (2004). Induction of haploid morphogenic calluses from in vitro cultured anthers of *Prunus armeniaca* cv. 'Harcot'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 35–41.
- Pico, G. (2015). Caracterización de la respuesta de *Elaeis guineensis* Jacq a *Phytophthora palmivora* por métodos microscópicos y bioquímicos (Tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander.
- Ponappa, T., Brzozowski, A.E., & Finer, J.J. (2000). Transient expression and stable transformation of soybean using jellyfish green fluorescent protein (GFP). *Plant Cell Reports*, 19, 6-12.
- Potrykus, I. (1991). Gene transfer to plants—assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 205–225.
- Protocolo operativo estandarizado. POE-Histoquímicas para discos de hoja de foliolos de palma V1. Cenipalma.
- Pulido-Rendón, A.J. (2014). Evaluación transitoria del promotor del gen de la proteína de la capsida del *virus del mosaico de la papa* (PYMV) – Colombia en

plantas de tabaco. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

Qutob, D., Kamoun, S., & Gijzen, M. (2002). Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *The Plant Journal*, 32, 361–373.

Randall, T.A., Dwyer, R.A., Huitema, E., Beyer, K., Cvitanich, C., Kelkar, H., Fong, A.M., Gates, K., Roberts, S., Yatzkan, E., Gaffney, T., Law, M., Testa, A., Torto-Alalibo, T., Zhang, M., Zheng, L., Mueller, E., Windass, J., Binder, A., Birch, P.R., Gisi, U., Govers, F., Gow, N.A., Mauch, F., van West, P., Waugh, M.E., Yu, J., Boller, T., Kamoun, S., Lam, S.T., & Judelson, H.S. (2005). Large-scale gene discovery in the oomycete *Phytophthora infestans* reveals likely components of phytopathogenicity shared with true fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (3), 229-43.

Rao, A.Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A.A., Husnain, T., Riazuddin S. (2009). The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, 27, 753–763.

Ren, D., Yang, H., & Zhang, S. (2002). Cell death mediated by mitogen-activated protein kinase pathway is associated with the generation of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Journal of Biology & Chemistry*, 277, 559–565.

Ruíz-Medrano, R., Guevara-González, R., Arguello-Astorga, G., Monsalve-Fonnegra, Z., Herrera-Estrella, L., & Rivera-Bustamante, R. (1999). Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the pepper huasteco virus coat protein gene. *Virology*, 253, 162- 169.

Russell, J.A., Roy, M.K., & Sanford, J.C. (1992). Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiology*, 98, 1050-1056.

Salazar, S.M., Castagnaro, A.P., Arias, M.E., Chalfoun, N., Tonello, U., Díaz-Ricci, J.C. (2006). Induction of a defense response in strawberry mediated by an

- avirulent strain of *Colletotrichum*. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 109–122.
- Sanford, J.C. (2000). The development of the biolistic process. *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant*, 36, 303-308.
- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D., & Allen, N. (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology: An International Journal*, 5 (1), 27-37, <http://doi.org/10.1080/02726358708904533>
- Sarria, G.A., Torres, G.A., Aya, H.A., Ariza, J.G., Rodríguez, J., Vélez, D.C., Varón, F., & Martínez, G. (2008). *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del Cogollo (PC) de la palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 29, 31–41.
- Schopke, C., Taylor, N.J., Carcamo, R., & Beachy, R.N. (1997). Optimization of parameters for particle bombardment of embryogenic suspension cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using computer image analysis. *Plant Cell Reports*, 16, 526-530.
- Schornack, S. (2016). Nuevas estrategias para el control de enfermedades de la palma de aceite mediante la investigación de patógenos de la planta. *Palmas*, 37 (Especial Tomo I), 119-122.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., & Lamb, C.J. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*, 9, 261–270.
- Šnyrychová, I., Ayaydin, F., & Hideg, É. (2009). Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo – a comparison of methods. *Physiologia Plantarum*, 135, 1-18.
- Talbot, N.J. (2003). On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, 57, 177–202.

- Thomasset, B., Ménard, M., Boetti, H., Denmat, L.A., Inzé, D., & Thomas, D. (1996). β -Glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic tobacco cells: specific elimination of plant inhibitors and minimization of endogenous *GUS* background. *Plant Science*, 113, 209–219.
- Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insight into processes of nonhost resistance. *Current Opinion Plant Biology*, 6, 351–357.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., & Collinge, D.B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11, 1187–1194.
- Torres, G.A., Sarria, G.A., Martínez, G., Varón, F., Drenth, A., & Guest, D.I. (2016). Bud rot caused by *Phytophthora palmivora*: A destructive emerging disease of oil palm. *Phytopathology*, 106, 320-329.
- Torres, G. A., Sarria, G. A., Varon, F., Coffey, M. D., Elliott, M. L., & Martinez, G. (2010). First report of bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on african oil palm in Colombia. *Plant Disease*, 94 (9), 1163. <http://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1163A>.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., & Jones, J.D.G. (2002). *Arabidopsis* *gp91phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99 (1), 517–522. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.012452499.
- Uma, B., & Podile, A.R. (2015). Apoplastic oxidative defenses during non-host interactions of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) with *Magnaporthe grisea*. *Acta Physiologiae Plantae*, 37 (26) 1-10. <http://doi.org/10.1007/s11738-015-1779-x>.
- van der Hoorn, R & Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell*, 20 (8) 1-10.

<https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>.

- Vain, P., Worland, B., Kohli, A., Snape, J.W., & Christou, P. (2000). Green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. *Theoretical and Applied Genetics*, 9, 164-169.
- Valerio, R., & García, E. (2008). Transformación genética de plátano (*Musa* sp. cv. hartón) mediante biobalística aplicada a tejidos meristemáticos. *Interciencia*, 33 (3), 225 – 231.
- Vitha, S., Beneš, K., Phillips, J., & Gartland, K. (1995). Histochemical localization of β - Glucuronidase (GUS) reporter activity in plant tissues. *Methods in Molecular Biology*, 44, 185 – 193.
- Vleeshouwers, V. G. A. A., & Oliver, R. P. (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic , hemibiotrophic , and necrotrophic plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27 (3), 196–206. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0313-IA>.
- Vleeshouwers, V. G. A. A., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Oh, S., Wang, M., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R.G.F., Jacobsen, E., Govers, F., Kamoun, S., Van der Vossen, E. A. G. (2008). Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS ONE* (www.plosone.org), 3 (8), e2875, 1-10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0002875>.
- Wahid, M. B., Nor, S., Abdullah, A., & Henson, I. E. (2004). Oil Palm – Achievements and Potential. "New directions for a diverse planet". 4th International Crop Science Congress, October 2004, Brisbane, Australia. Web site www.cropscience.org.au
- Wang, Y., & Huang, Q. (2011). Assays for effector-mediated suppression of programmed cell death in yeast. En McDowell J.M. (ed.), *Plant Immunity: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 712, 173–180, Springer. http://doi.org/10.1007/978-1-61737-998-7_14.

- Wang, C-H., Huang, L-L., Buchenauer, H., Han, Q-M., Zhang, H-C., & Kang, Z-S. (2007). Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O_2^- and H_2O_2) in the incompatible and compatible interaction of wheat - *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71, 230–239.
- Wang, C-H., Huang, L-L., Zhang, H-C., Han, Q-M., Buchenauer, H., & Kang, Z-S. (2010). Cytochemical localization of reactive oxygen species (O_2^- and H_2O_2) and peroxidase in the incompatible and compatible interaction of wheat - *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 221-229.
- Weßling, R., Epple, P., Altmann, S., He, Y., Yang, L., Henz, S.R., McDonald, N., Wiley, K., Bader, K.C., Gläßer, C., Mukhtar, M.S., Haigis, S., Ghamsari, L., Stephens, A.E., Ecker, J.R., Vidal, M. Jones, J.D.G., Mayer, K.F.X., van Themaat, E.V.L., Weigel, D., Schulze-Lefert, P., Dangl, J.L., Panstruga, R., & Braun, P. (2014). Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. *Cell Host & Microbe*, 16, 364–375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.08.004>.
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D.G.O., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S.A., & Kamoun, S. (2012). Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, 235–247. <http://doi.org/10.1101/sqb.2012.77.015933>.
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I.K., Pritchard, L., & Birch, P.R.J. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, 450 (November), 115–118. <http://doi.org/10.1038/nature06203>.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 322, 681-92.

- Zainal, A., & Abdullah, R. (1996). Transformation of oil palm (*Elaeis guineensis* J.) immature embryos by particle bombardment. *Second National Congress on Genetics*, 13-15/11/1996, Genetics Society of Malaysia.
- Zhang, H., Wang, C., Cheng, Y., Wang, X., Li, F., Han, Q., Xu, J., Chen, X., Huang, L., Wei, G., & Kang, Z. (2011). Histological and molecular studies of the non-host interaction between wheat and *Uromyces fabae*. *Planta*, 234, 979–991. <http://doi.org/10.1007/s00425-011-1453-5>.
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion Immunology*, 20, 10–16.
- Zubaidah, R., & Siti Nor Akmar, A. (2003). Development of a transient promoter assay system for oil palm. *Journal of Oil Palm Research*, 15 (2), 62-69.
- Zuraida, A.R., Rahiniza, K., Nurul, M.R., Suri, R., Zamri, Z., & Sreeramanan, S. (2010). Factors affecting delivery and transient expression of *gusA* gene in Malaysian indica rice MR 219 callus via biolistic gun system. *African Journal of Biotechnology*, 9 (51), 8810-8819. DOI: 10.5897/AJB10.1467.